

Université de Sherbrooke

**Étude du protocole d'illumination sur le métabolisme tumoral
en thérapie photodynamique du cancer à l'aide de l'imagerie
tomographique d'émission par positrons**

Rédigé par
Kim Mongrain

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des
sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en
Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mars 2009

Dr Johan E. van Lier, Sciences des radiations et imagerie biomédicale
Dr Roger Lecomte, Sciences des radiations et imagerie biomédicale
Dr Benoît Paquette, Sciences des radiations et imagerie biomédicale
Dr Caroline Saucier, département d'anatomie et de biologie cellulaire,
Université de Sherbrooke



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-65640-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-65640-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
RÉSUMÉ	- 10 -
INTRODUCTION	- 14 -
1- Thérapie Photodynamique (TPD).....	- 15 -
1.1-Principe de la thérapie photodynamique	- 17 -
1.2-Agents photosensibilisateurs	- 19 -
1.3-La lumière.....	- 23 -
1.4-Mécanismes d'action de la TPD.....	- 26 -
2- Tomographie d'émission par positrons (TEP).....	- 30 -
2.1- Principe général de la TEP	- 30 -
2.2-Les radiotraceurs utilisés en TEP	- 31 -
2.3- Applications de l'imagerie TEP.....	- 32 -
2.4- Le métabolisme tumoral	- 34 -
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	- 37 -
1-Culture cellulaire	- 37 -
2- Modèle animal	- 39 -
3- Photosensibilisateur	- 39 -
4-Protocole d'expérimentation TPD.....	- 40 -
5- Imagerie TEP	
5.1- Appareil TEP dédié aux petits animaux de Sherbrooke	- 42 -
5.2- Reconstruction de l'image	- 42 -
5.3- Analyse des images	- 42 -
5.4- Analyse statistique.....	- 44 -
6- Imagerie TEP / IRM	- 44 -
RÉSULTATS	- 45 -
1-Taux de captation tumoral du FDG	- 45 -
2- Délai de réponse et de restauration de la captation tumorale de FDG.....	- 51 -
DISCUSSION	- 55 -
1- Métabolisme initial (pente 1).....	- 57 -

2- Effet métabolique de la TPD (pente 2 et 3)	- 58 -
2.1-Bas taux de fluence (25 et 50 mW/cm ²)	- 67 -
2.2-Hauts taux de fluence (100 à 200 mW/cm ²)	- 68 -
3-Délais de réponse ($\Delta 1$) et délais de restauration	- 69 -
de la captation tumorale de FDG ($\Delta 2$)	- 69 -
CONCLUSION	- 71 -
REMERCIEMENTS	- 73 -
BIBLIOGRAPHIE	- 75 -

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

- Figure 1- Étapes de la thérapie photodynamique du cancer (TPD).....-17-
- Figure 2- Mécanismes d'action impliqués dans la production de dommages oxydatifs en TPD.....-19-
- Figure 3- Photofrin[®] - Structure chimique des composés retrouvés dans le Photofrin[®]-22-
- Figure 4- Émission du positron associée au principe de la TEP.....-31-
- Figure 5- A) Structure chimique du [¹⁸]-Fluorodéoxyglucose
B) Représentation schématique de la cinétique du FDG dans les tissus....-36-
- Figure 6- Rat en position dorsale sur le lit d'acquisition d'imagerie TEP.....-40-
- Figure 7- Protocole expérimental de l'imagerie TEP en temps réel de la TPD.....-41-
- Figure 8- Schéma des 5 paramètres analysés dans la courbe d'activité en fonction du temps de la tumeur traitée à la TPD.....-43-
- Figure 9- Activité des tumeurs durant le protocole d'imagerie TEP en temps réel....-46-
- Figure 10- Graphique de la captation tumorale de FDG selon le temps sans Illumination.....-47-
- Figure 11- Graphique de la captation tumorale de FDG en temps réel avec illumination, mais sans administration de PS.....-48-
- Figure 12- Taux de captation tumoral du FDG (comptes/pixel /min) avant, pendant et après la TPD selon différents taux de fluence.....-49-
- Figure 13- Images obtenues en TEP et IRM à différents temps post-TPD à 50 et 200 mW/cm².....-53-
- Figure 14- Recalage et fusion manuelle d'images TEP et IRM prises non-simultanément du même animal à différents temps post-TPD.....-54-
- Figure 15- Cascades extrinsèques et intrinsèques impliquées dans l'activation des caspases et de l'apoptose (AGOSTINIS et al., 2004).....-61-

Tableaux

Tableau 1- Radiotraceurs couramment utilisés au cours des études TEP en oncologie.-32-

Tableau 2-Valeurs de pentes selon l'analyse en 5 paramètres.....-51-

Tableau 3- Valeurs des délais $\Delta 1$ et $\Delta 2$-52-

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\Delta 1$:	Délai de réponse
$\Delta 2$:	Délai de restauration
α :	Coefficient d'atténuation
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ALA :	Acide 5-aminolévulinique
ATP:	Adénosine triphosphate
β^+ :	Particule bêta plus ou positron
BGO :	Scintillateur formé de $\text{Bi}_4\text{Ge}_3\text{O}_{12}$
BPD :	Dérivés benzoporphyrines
$[^{11}\text{C}]$ -Acétate :	Acétate marqué au ^{11}C Carbone
$[^{11}\text{C}]$ -Acétoacétate :	Acétoacétate marqué au ^{11}C Carbone
CIMS :	Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke
DMLA :	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
ε :	Coefficient d'absorption molaire
EMEM :	Eagle's minimum essential medium
FDG :	2-déoxy-2- $[^{18}\text{F}]$ -fluoro-D-glucose
FLT:	$[^{18}\text{F}]$ -déoxyfluorothymidine
FES:	16-alpha- $[^{18}\text{F}]$ -fluoroestradiol
FMISO:	$[^{18}\text{F}]$ -misonidazole
Gd-DTPA:	Complexe gadolinium-acide diéthylènetriaminepentaacétique
GLUT:	Protéine de transport du glucose

H_2O^{15} :	Eau marquée à l' 15 oxygène
HIF-1a	Facteur inductible de l'hypoxie « Hypoxia inducible factor »
HpD :	Dérivé hématorporphyrique
HPPH :	2-(1-Hexyloxyéthyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a
IRM:	Imagerie par résonance magnétique
i.v.:	Intra-veineux
LDL :	Lipoprotéine de basse densité « Low density lipoprotein »
LGSO :	Scintillateur formé de $Lu_{0,4}Gd_{1,6}SiO_5$
LS11 :	Talaporfin sodium
LYSO :	Scintillateur formé de $Lu_{1,9}Y_{0,1}SiO_5$
MAC :	Adénocarcinome mammaire « Mammary adenocarcinoma »
MLEM :	Maximisation de l'attente du maximum de vraisemblance « Maximum likelihood expectation maximization »
m-THPC :	Temoporfin
$^{13}NH_3$:	Ammoniac marqué à l' 13 Azote
NPe6 :	Mono-L-aspartyl chlorure e6
1O_2 :	Oxygène singulet
O_2 :	Oxygène à l'état triplet
$^3P^*$:	Photosensibilisateur à l'état excité triplet
P^- :	Photosensibilisateur réduit
PS :	Photosensibilisateur
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène « Reactive oxygen species »

S(O) :	Domages oxydatifs
$t_{1/2}$:	Temps de demi-vie radioactive
TDM :	Tomodensitométrie
TEP :	Tomographie d'émission par positrons
TNF- α :	Facteur de nécrose tumoral alpha « Tumor necrosis factor alpha »
TPD :	Thérapie photodynamique
ν :	Neutrino

RÉSUMÉ

Étude du protocole d'illumination sur le métabolisme tumoral en thérapie photodynamique du cancer à l'aide de l'imagerie tomographique d'émission par positrons

Kim Mongrain

Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke

La thérapie photodynamique (TPD) est un traitement du cancer alternatif aux méthodes déjà bien connues telles que la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie. La TPD nécessite trois composantes afin de détruire les tissus cancéreux : un agent photosensibilisateur (PS) localisé préférentiellement dans la tumeur, l'oxygène moléculaire présent dans l'environnement tumoral et un faisceau lumineux focalisé à une longueur d'onde permettant l'activation du PS. Les dommages oxydatifs induits par la TPD peuvent être causés selon deux mécanismes d'action et ensuite provoquer différents types de réponse au niveau des cellules tumorales et de leur environnement. En effet, la TPD peut s'attaquer aux cellules tumorales et à leurs constituants directement ou bien détruire la microvascularisation tumorale responsable de l'apport en nutriments et en oxygène. Cette destruction massive engendre par la suite des réponses immunitaires et inflammatoires de différente intensité selon le type de protocole de TPD utilisé. Plusieurs variations de protocole sont possibles en TPD du cancer et la modulation de la lumière à différents niveaux tels que la durée de l'illumination, le débit et la dose totale, semble être un facteur important dans la réponse cellulaire métabolique suite au traitement. En effet, le taux de fluence peut influencer la réponse métabolique des cellules tumorales tout comme la réponse inflammatoire et immunitaire. L'hypothèse de recherche de ces travaux

est d'identifier un régime d'illumination optimal favorisant la destruction des cellules tumorales tout en diminuant les effets secondaires induits par le traitement à la TPD. L'étude du protocole d'illumination peut offrir un moyen de mieux comprendre l'implication du débit de lumière dans la réponse tumorale au traitement.

La tomographie d'émission par positrons (TEP) est un outil d'imagerie moléculaire non-invasif et très sensible permettant d'étudier plusieurs processus biologiques, physiologiques et moléculaires *in vivo* dans divers domaines tels que la cardiologie, la neurologie et l'oncologie. Au Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS), la recherche préclinique impliquant la TEP propose, quant à elle, un moyen facile, rapide et non-invasif d'améliorer le développement de nouvelles thérapies et de nouveaux radiotraceurs permettant la détection plus précoce de certains cancers. Le [¹⁸F]-fluorodéoxyglucose (FDG) demeure néanmoins le traceur le plus utilisé tant au niveau clinique que préclinique pour évaluer le métabolisme tumoral.

La combinaison de l'imagerie TEP à la TPD offre donc une méthode prometteuse pour évaluer l'effet du traitement sur le métabolisme tumoral. D'une part, les modifications de consommation tumorale de glucose permettent de caractériser l'efficacité du traitement résultant de différents taux de fluence. D'autre part, l'observation en temps réel des effets transitoires au niveau du métabolisme tumoral durant la période de traitement a le potentiel de fournir des informations sur les mécanismes d'action de la TPD. En effet, des études antérieures ont permis de démontrer les possibilités offertes par cette combinaison dans l'étude de l'efficacité des PS et dans la détermination de mécanismes d'action responsable de l'action anti-tumorale de la TPD.

Ce mémoire propose comme objectif global d'explorer l'apport d'une approche complémentaire aux études *in vitro* et aux procédures *in vivo* courantes visant à mieux comprendre la relation entre le débit de lumière et les effets observés à différents temps post-traitement grâce à l'observation des phénomènes survenant immédiatement après le début de l'illumination. Plus spécifiquement, les objectifs sont de déterminer quels sont les taux de fluence favorisant la meilleure réponse métabolique suivant la TPD, d'évaluer le temps de nécessaire afin d'observer un changement métabolique tumoral et de tenter de comprendre quels sont les mécanismes impliqués durant la TPD lorsqu'il y a une variation du taux de fluence. Un modèle animal de rat, portant 2 tumeurs d'adénocarcinome mammaire, a été utilisé lors des expérimentations de TPD combinées à l'imagerie TEP en temps réel. Les résultats obtenus ne parviennent pas à cerner précisément les mécanismes responsables des changements transitoires durant l'illumination, ni à prouver quel taux de fluence serait le plus efficace métaboliquement. Par contre, il est possible d'observer 2 groupes répondant différemment à la TPD : les bas (25 et 50 mW/cm²) et les hauts taux de fluence (100 à 200 mW/cm²). Les résultats de ces 2 groupes soutiennent des hypothèses de travaux en cours ou déjà publiés concernant la vascularisation et l'inflammation et démontre la faisabilité d'étude d'un modèle de variation de traitement grâce à l'imagerie TEP. D'ailleurs, en plus d'avoir démontré l'intérêt de visualiser la réponse tumorale métabolique et inflammatoire en temps réel durant le traitement, ce projet de recherche pave la voie à l'usage d'autres radiotraceurs afin de mettre en évidence l'effet d'autres processus métaboliques et physiologiques durant et à la suite de la TPD, tels l'apoptose, la stase vasculaire et l'hypoxie. Il s'avère aussi intéressant dans le développement d'autres protocoles d'imagerie en temps réel, tel

que pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), en fournissant de solides bases d'interprétation concernant les changements tumoraux transitoires.

Mots clés : Thérapie photodynamique du cancer (TPD), tomographie d'émission par positrons (TEP), taux de fluence, métabolisme tumoral, réaction immunitaire associée à la thérapie photodynamique (TPD)

INTRODUCTION

L'imagerie biomoléculaire est une branche grandissante de la recherche biomédicale. La tomographie d'émission par positrons (TEP) est l'une de ces technologies émergentes. Son utilisation en imagerie fonctionnelle a été démontrée comme étant des plus efficaces dans le domaine de la cardiologie, la neurologie et de l'oncologie. De plus, cette technologie est dorénavant aussi utilisée au niveau du développement pharmaceutique tout comme pour certaines études comportementales. L'oncologie clinique demeure néanmoins la plus connue des disciplines utilisant la TEP. De la détection d'une masse tumorale et de ses métastases au suivi de la réponse tumorale suite au traitement, la TEP permet de caractériser au niveau moléculaire les dérèglements métaboliques et fonctionnels, offrant ainsi un complément à l'imagerie anatomique traditionnelle (tomodensitométrie et imagerie par résonance magnétique).

La thérapie photodynamique (TPD) est une technique de traitement du cancer prometteuse impliquant simultanément l'oxygène, la lumière et une molécule photosensibilisatrice. Son utilisation clinique demeure toutefois restreinte vue sa complexité et la variabilité de son protocole d'utilisation. L'utilisation de l'imagerie TEP combinée à la TPD permettra de mieux comprendre la réponse métabolique tumorale suite au traitement, donnant ainsi des informations nécessaires à l'amélioration du protocole d'utilisation de la TPD.

Nous aborderons ainsi dans ce chapitre les principes fondamentaux du fonctionnement de la thérapie photodynamique et de la tomographie d'émission par positrons, afin de mieux démontrer l'utilité de la TEP dans l'évaluation de différents protocoles d'illumination au niveau de la réponse tumorale métabolique.

1 -Thérapie Photodynamique (TPD)

On estime à 166 400 le nombre de nouveaux cas de cancer et à 73 800 le nombre de décès causés par cette maladie en 2008 au Canada. D'ailleurs, selon les taux d'incidence canadiens du cancer pour l'année 2008, 40% des femmes et 45% des hommes seront atteints d'un cancer au cours de leur vie et malheureusement 1 canadien sur 4 en mourra (Société canadienne du cancer, 2008). La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les trois méthodes les plus conventionnelles pour le traitement du cancer. Par contre, ces techniques impliquent plusieurs effets secondaires systémiques importants. Par conséquent, le développement de nouvelles méthodes de traitement ayant une grande sélectivité et spécificité aux tissus tumoraux demeure une priorité dans le domaine de l'oncologie. Souvent qualifiée de photochimiothérapie (DOUGHERTY, 1998), la thérapie photodynamique (TPD) est considérée comme un traitement très prometteur contre le cancer ayant des effets secondaires minimes. La TPD est basée sur la photooxydation d'un tissu biologique suite à la présence d'un agent photosensibilisant dans les constituants cellulaires de ce même tissu (FOOTE, 1991). L'injection du photosensibilisateur (PS) dans l'organisme est la première étape du traitement. Suivent ensuite l'exposition locale du tissu à une source lumineuse de longueur d'onde spécifique, l'absorption des photons incidents par le PS et les réactions photochimiques impliquant l'oxygène moléculaire responsable des dommages oxydatifs (HENDERSON et

DOUGHERTY, 1992) (Fig.1). Le principal avantage de la TPD en oncologie est dû à la captation préférentielle du PS par les tissus tumoraux pour une longue période comparativement aux autres tissus sains, résultant en plusieurs possibilités thérapeutiques (HSI et al., 1999). De plus, il est possible de limiter l'étendue de l'action photosensibilisatrice sur une région très précise en restreignant le faisceau lumineux grâce à l'utilisation de lasers à rayons focalisés (SHARMAN et al., 1999). Grâce aux méthodes endoscopiques, plusieurs sites tumoraux sont désormais accessibles pour le traitement local à la TPD. Dépendamment de la longueur d'onde choisie pour l'illumination, le traitement peut atteindre jusqu'à environ 10 mm de profondeur à l'intérieur des tissus (ALLISON et al., 2004). Contrairement à la chimiothérapie et la radiothérapie, les effets secondaires de la TPD, l'inflammation notamment, ne se concentrent qu'à la région traitée ou affectent peu le patient (photosensibilisation de la peau). Ceci confère à la TPD un net avantage en matière de traitement du cancer (MACDONALD et DOUGHERTY, 2001). La TPD comporte par contre ses limitations, telles que le type de tissus cancéreux visés et leur localisation. En effet, des tissus tumoraux disséminés ne peuvent être traités dans leur entièreté avec la TPD tout comme des tumeurs qui sont inaccessibles à un faisceau lumineux. À ce jour, la TPD est approuvée comme traitement clinique contre le cancer dans certains pays européens, au Canada et aux États-Unis. L'usage de cette technique est surtout réservé aux cancers de la peau, de l'œsophage (œsophage de Barret) et certains cancer du poumon (BROWN et al., 2004). Plusieurs recherches tendent à démontrer de bons résultats comme traitement complémentaire à la chirurgie dans les cas de quelques cancers intrapéritonéaux, de glioblastomes et de mésothéliomes (MENON et al., 2001, FRIEDBERG et al., 2003, MULLER et WILSON, 1996, POPOVIC et al., 1996). La TPD n'est pas seulement restreinte au traitement du cancer, puisque plusieurs

autres domaines de la médecine utilisent cette technologie. En effet, la TPD est aujourd'hui couramment pratiquée pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et pour le traitement esthétique de problèmes de peau (SHARMAN et al., 1999).

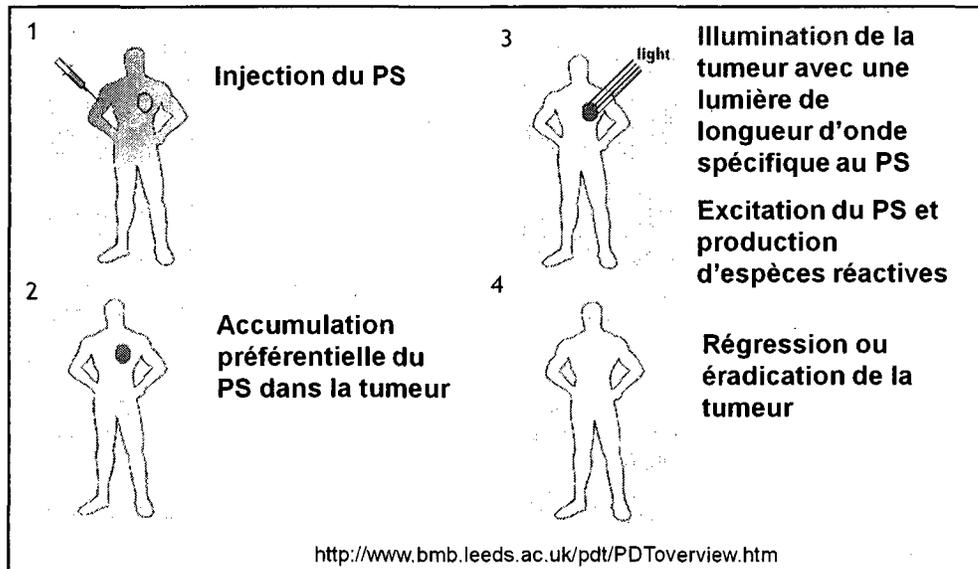


Fig.1 Étapes de la thérapie photodynamique du cancer (TPD)

1- Administration d'un agent photosensibilisateur (PS) 2- Accumulation et rétention du PS dans le tissu tumoral après plusieurs heures 3- Illumination focalisée du tissu tumoral avec la longueur d'onde appropriée pour générer la production d'espèces réactives 4- Dommages oxydatifs pouvant mener à l'éradication complète de la tumeur

Image adaptée de <http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/PDToverview.htm>

1.1-Principe de la thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique du cancer comporte trois composantes indissociables les unes des autres pour un bon fonctionnement : un photosensibilisateur, l'oxygène moléculaire et la lumière. Prises indépendamment, ces trois composantes ne sont pas nocives, mais leur combinaison dans des conditions optimales permettent la destruction

de tissus tumoraux (HENDERSON et DOUGHERTY, 1992). Le protocole de traitement débute avec l'administration intraveineuse ou topique du PS, celui-ci s'accumule par la suite préférentiellement dans les tumeurs ou demeure dans la vascularisation afin d'être activé par la lumière (PENG Q. et al., 1996). Le choix de la lumière se doit d'être très spécifique au spectre d'absorption du PS et assez énergétique pour traverser suffisamment les tissus biologiques (WILSON et PATTERSON, 2008).

Lorsque le PS reçoit la lumière via une source lumineuse à longueur d'onde spécifique, il est excité dans un état électronique triplet ($^3P^*$) duquel il peut réagir selon deux types de mécanisme (type-I ou type-II) (Fig. 2). La réaction de type-I est surtout associée aux environnements anoxiques où le PS dans l'état triplet ($^3P^*$) réagit directement avec le substrat organique par un échange d'électron ou par l'arrachement de protons créant ainsi un substrat oxydé et un PS réduit (P^-). Ceux-ci peuvent à leur tour réagir avec l'oxygène moléculaire pour créer des espèces réactives d'oxygène cytotoxiques (ROS). L'intensité de ce type de réaction est dépendante de la concentration du substrat ciblé.

Pour le mécanisme de type-II, le PS dans l'état triplet ($^3P^*$) peut transférer son énergie à une molécule d'oxygène à l'état triplet (O_2), produisant ainsi de l'oxygène moléculaire singulet (1O_2). Cet oxygène singulet a par la suite la capacité de créer des dommages oxydatifs à un très grand nombre de substrats biologiques. La diffusion de l' 1O_2 est cependant restreinte à 1 μm dans le tissu et son temps de demi-vie dans l'environnement biologique est estimé à 0.04 secondes (SHARMAN et al., 2000 ; MACDONALD et DOUGHERTY, 2001). Même si les deux types de réaction sont dépendants de l'oxygène,

le mécanisme de type-II est celui retenu comme étant le principal responsable de la mort cellulaire tumorale. La réaction de type-I n'est toutefois pas négligeable dans le cas où le PS est hautement concentré et sous des conditions nettement hypoxiques (MACDONALD et DOUGHERTY, 2001 ; FOOTE, 1984).

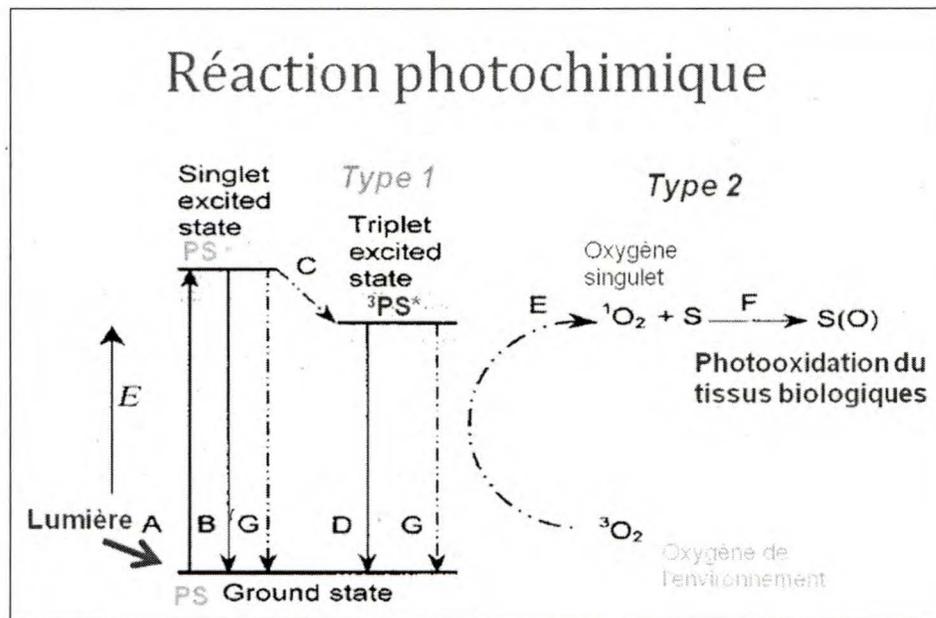


Fig. 2 Mécanismes d'action impliqués dans la production de dommages oxydatifs en TPD.

(Figure adaptée de MACDONALD et DOUGHERTY, 2001)

PS : photosensibilisateur, PS* : photosensibilisateur activé par la lumière, $^3PS^*$: photosensibilisateur à l'état excité triplet, S : substrat, 3O_2 : oxygène à l'état triplet présent dans l'environnement tumoral, S(O) : Dommages oxydatifs, 1O_2 : oxygène singulet

1.2-Agents photosensibilisateurs

Les agents photosensibilisateurs sont des molécules absorbant la lumière à une longueur d'onde qui leur est spécifique et qui sont capables de la transformer en énergie utile. Lors de la TPD, cette énergie participe à la production d'agents létaux cytotoxiques (SHARMAN et al., 1999). Une des caractéristiques notoires des PS est leur capacité à se loger de façon préférentielle dans les tissus tumoraux, ce qui permet aux réactions

cytotoxiques de se localiser principalement dans les tissus ciblés. Par contre, pour certains PS, leurs actions cytotoxiques sont plus efficaces au niveau de la vascularisation tumorale. Dans ce cas-ci, la spécificité tumorale de la TPD est obtenue via l'illumination localisée.

L'usage thérapeutique de la lumière a fait sa première apparition au début du 20^e siècle avec Raab qui a remarqué qu'une combinaison entre l'orange acridine et la lumière pouvait détruire de petits organismes tels que les paramécies (RAAB, 1900). Ensuite entre 1940 et 1960, Figge et Rasmussen-Taxdal ont administré chez des patients et des animaux ayant des tumeurs des composés naturels de porphyrine dans le but de détecter les tumeurs grâce à la propriété fluorescente des porphyrines (FIGGE, 1945 ; FIGGE et al., 1948 ; RASMUSSEN-TAXDAL et al., 1955). Tout au long du 20^e siècle, plusieurs expériences visant le traitement de tissus tumoraux par l'utilisation de produits photosensibilisateurs ont été tentées (LIPSON et al., 1961; DRAKKIN, 1978; DOUGHERTY et al., 1978). Ce n'est par contre que vers 1970 que la TPD a pris son réel essor grâce aux travaux de Dougherty sur les dérivés hématorporhyriques (HpD) (DOUGHERTY, 1974). De plus, l'identification de l'oxygène singulet comme étant le produit cytotoxique de la réaction photochimique par Weishaupt a grandement contribué au développement de la TPD (WEISHAUPT et al., 1976). Depuis l'avènement des dérivés hématorporhyriques (HpD), plusieurs PS ont été développés dans le but d'améliorer leur sélectivité pour les tumeurs, d'augmenter leur efficacité thérapeutique et de diminuer les effets secondaires de photosensibilisation post-traitement. Globalement, les PS sont classés en deux catégories : les PS de première et de deuxième génération. Les PS de 1^{ère} génération sont des dérivés hématorporhyriques (HpD) comprenant le porfimer

sodium (Photofrin[®]). Les PS de seconde génération quant à eux, ont de meilleurs caractéristiques favorisant leur utilisation en clinique telles qu'une période de photosensibilité diminuée, une longueur d'onde d'activation plus élevée permettant une augmentation dans la pénétration de la lumière dans les tissus et une sélectivité élevée pour les cellules tumorales versus les cellules saines. Ces nouveaux agents photosensibilisateurs incluent les chlorines avec les dérivés benzoporphyrines (BPD) et le méta-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC), l'acide 5-aminolévulinique (ALA) et les phtalocyanines (ALLISON et al., 2004 ; SHARMAN et al., 1999 ; BROWN et al., 2004). Malgré la multitude de PS disponibles, peu sont utilisés cliniquement pour le traitement du cancer. De ceux-ci, le porfimer sodium commercialisé par Axcan Pharma Inc. sous le nom de Photofrin[®] est de loin le plus connu dans ce domaine (Fig. 3).

L'utilisation clinique du Photofrin[®] est limitée au cancer de l'œsophage, au cancer du poumon endobronchique et au syndrome de l'œsophage de Barret avec dysplasie de haut grade (AXCAN PHARMA inc.). Celui-ci est un mélange complexe et variable de HpD, ce qui rend sa reproductibilité difficile et sa synthèse ardue. Malgré sa très bonne efficacité, ce PS provoque une photosensibilité cutanée prolongée de quelques mois due à son excrétion lente (WOHRLE et al., 1998). À cause des inconvénients de ce PS, plusieurs recherches se sont concentrées sur le développement de nouveaux PS plus purs et ayant de meilleures propriétés utiles pour la TPD. Globalement, les nouveaux PS ne doivent pas être toxiques sans l'illumination, non mutagènes ou carcinogènes, avoir une élimination rapide, avoir une bonne sélectivité pour les tissus ciblés, être facilement administrables, être un composé dont la synthèse est aisément reproductible, être sécuritaire pour la vie du patient et absorber la lumière entre 600 et 800 nm (ALLISON et

al., 2004). D'après certaines caractéristiques, plus particulièrement une meilleure absorption lumineuse et une longueur d'onde spécifique d'absorption plus élevée, ces PS permettent d'administrer une plus faible dose de lumière et d'obtenir une plus grande pénétration dans le tissu (WOHRLE et al., 1998). Les PS de seconde génération se retrouvent dans toutes les classes énumérées précédemment.

Le Photofrin[®] est le plus utilisé et le plus étudié des PS. Il est normalement constitué de monomères, dimères, trimères et de plus gros oligomères pouvant atteindre 8 ou 9 groupements porphyriques. Par contre, sa fraction purifiée active lors de la TPD ne concerne que les oligomères de 8 ou 9 groupements (PANDEY et al., 1989 ; PANDEY et al., 1990). Le Photofrin[®] possède une absorption dans le spectre de lumière rouge à 630 nm et il peut être activé avec cette lumière jusqu'à 5 mm de profondeur. D'après les essais cliniques, le Photofrin[®] ne provoque pas d'effet secondaires systémiques et n'est pas mutagène ni carcinogène aux doses recommandées. Il est utilisé à une dose de 2 mg/kg et son illumination s'effectue 48 h après son administration intraveineuse (AXCAN PHARMA INC.).

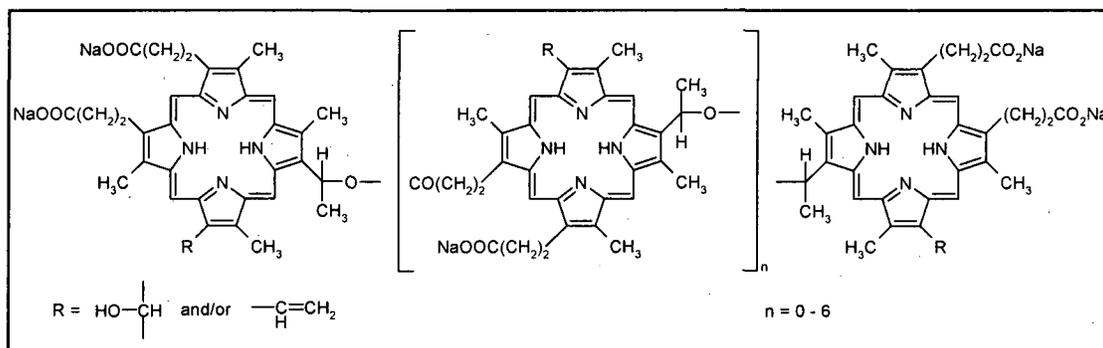


Fig. 3 Photofrin[®] - Structure chimique des composés retrouvés dans le Photofrin[®].
(AXCAN PHARMA INC., 2007)

La TPD appliquée en oncologie sert principalement à traiter les cancers de la peau, du tractus aéro-digestif, de la vessie, du sein, du cou et de la tête. D'autres applications pour des conditions non-apparentées au cancer sont aussi traitées avec la TPD. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), les kératoses actiniques, l'acné, le psoriasis et la stérilisation du plasma sanguin sont quelques exemples où la TPD peut être utile (BROWN et al., 2004 ; SHARMAN et al., 1999 ; DOUGHERTY et al., 1998 ; PASS, 1993). Même si la TPD est un moyen de traitement efficace et prometteuse tant au niveau curatif que palliatif, elle demeure néanmoins une méthode de second choix lors de la planification de traitements en oncologie. Le manque de connaissances au niveau des meilleurs choix de combinaison lumière / PS est l'une des principales causes expliquant l'utilisation sous-optimale de la TPD en oncologie. En effet, l'existence de multiples combinaisons de traitements rend plus complexe les essais cliniques et la compréhension du traitement. Heureusement, les avancées en matière de compréhension des effets de la lumière et de l'oxygène, tout comme la combinaison avec d'autres méthodes de traitement ne peuvent qu'inciter la communauté médicale à introduire la TPD parmi l'arsenal des méthodes usuelles de traitement du cancer (BROWN et al., 2004).

1.3-La lumière

La lumière est l'un des trois constituants essentiel de la TPD. De la simple lumière du jour jusqu'aux lasers à longueur d'onde et puissance variables et précises, la lumière est le facteur déclencheur de la réaction de la TPD. La sélectivité du traitement à la TPD peut être obtenue grâce à l'accumulation sélective du PS dans la tumeur, mais aussi par une illumination très ciblée sur le tissu voulu, évitant ainsi tout dommage inutile aux tissus.

sains environnants (MACDONALD ET DOUGHERTY, 2001). Le développement des PS a été en grande partie influencé par les propriétés optimales (la longueur d'onde, la dose totale et le débit) de la lumière permettant leur activation. En effet, il a été démontré en 1984 par Svaasand, Wilson et al. et Bolin et al. qu'une longueur d'onde de 800 nm réussit à passer relativement librement dans les tissu biologiques. La profondeur de pénétration de la lumière est directement dépendante des propriétés optiques du tissu ainsi que de la longueur d'onde choisie pour la lumière. Le coefficient d'atténuation du tissu décrit la diminution exponentielle de l'intensité lumineuse en fonction de la distance parcourue. Ce coefficient (α) est ainsi spécifique pour chaque tissu. Donc, lorsque les photons entrent dans le tissu, une portion est réfléchié par la surface et ce qui reste est diffusé tout autour jusqu'à ce qu'ils soient absorbés par des chromophores biologiques ou bien qu'ils s'éloignent de la zone de traitement. Généralement, une petite quantité de photons réussit à passer à travers le tissu. Cette quantité diminue pour les longueurs d'onde inférieures à 800 nm, lesquelles sont de taille équivalente ou inférieure à celles des macromolécules du milieu (WILKISCH et al., 1984; SVAASAND 1984 ; WILSON et al., 1984; BOLIN et al., 1984).

Les paramètres d'illumination sont ainsi la longueur d'onde, la dose totale (fluence totale) et le débit (taux de fluence). Comme expliqué précédemment, la longueur d'onde doit se situer dans le spectre visible, rouge plus précisément, et tendre vers la valeur de 800 nm. Pour ce qui est du débit de lumière (taux de fluence), il a été démontré qu'un bas taux d'irradiation lumineuse favorise l'activité anti-tumorale *in vitro* (BELLNIER et LIN, 1985). De plus, selon les travaux de Tromberg et al., Gibson et al. et Foster et al., il existe une différence dans la réponse tumorale selon le régime d'illumination et cette différence

est basée sur le principe de la consommation photodynamique de l'oxygène (TROMBERG et al., 1990; GIBSON et al., 1990; FOSTER et al., 1991). Cette théorie est basée sur l'hypothèse que lorsqu'un tissu contenant un PS est soumis à de hauts taux de fluence (mW/cm^2), la consommation d'oxygène moléculaire visant la production d'oxygène singulet est trop importante comparativement à l'oxygène disponible grâce à l'approvisionnement fourni par la vascularisation. Les travaux de Nichols et al. ont d'ailleurs contribué à supporter cette hypothèse grâce à plusieurs expérimentations mesurant la concentration d'oxygène dans différents types de tumeurs traitées à la PDT (NICHOLS et al., 1994). Suite à cette publication, il aura fallu attendre plus de 10 ans pour que Henderson et al. suggèrent que le taux de fluence agit comme un important modulateur dans les mécanismes de la TPD. Il a donc été démontré selon ces études que le taux de fluence influence la consommation d'oxygène photochimique dans une tumeur *in vivo*. Il affecterait aussi la réponse des tumeurs et des tissus normaux, de même que les mécanismes anti-tumoraux tant au niveau du type des cellules impliquées que de l'étendue de la réponse (HENDERSON et al., 2006).

Lorsqu'il est question du taux de fluence, le phénomène de photoblanchiment ne peut être exclu. Ce phénomène se produit lorsque le PS est détruit par le processus d'illumination au lieu d'être activé. En effet, l'oxygène singulet produit détruit directement le PS au lieu de s'attaquer aux constituants cellulaires. Cette réaction est particulièrement importante avec les PS ayant une absorption molaire (ϵ) très élevée, mais n'est pas considéré comme un caractère influençant grandement la TPD (DOUGHERTY et POTTER, 1991; SVAASAND et al., 1992).

Liée directement au taux de fluence (mW/cm^2), la dose totale de lumière (J/cm^2) est calculée avec le taux de fluence utilisé selon le temps qu'il a été appliqué sur le tissu (Annexe 1). Tout dépendant du tissu à traiter et de son diamètre, la dose totale du traitement peut varier. Il est de plus possible de fractionner l'irradiation, c'est-à-dire d'intercaler des moments sans lumière durant la période d'illumination (exemple de schéma : 5 min d'illumination intercalée de 2 min de repos). Cette méthode favorise ainsi la réoxygénation du tissu durant le traitement augmentant donc la quantité d'oxygène disponible pour la production d'espèces réactives. La dose totale se trouve à être divisée tout au long de l'illumination, rendant les possibilités de régime extrêmement variées. En ce qui concerne ce type de protocole d'illumination, il n'y a pas de consensus à ce jour sur les meilleurs modèles à suivre. Avec l'utilisation clinique du Photofrin[®], la dose de PS injectée est de 2 mg / kg et le taux de fluence varie généralement selon l'appareil utilisé pour illuminer le tissu et la dose totale à administrer (il varie habituellement de 50 à 150 J / cm^2) (AXCAN PHARMA INC.). Dans tous les cas, le traitement se doit d'être le plus confortable possible pour le patient et être fait dans un temps acceptable.

1.4-Mécanismes d'action de la TPD

D'après les résultats obtenus suite à différentes études effectuées au cours des années, il a été démontré que la TPD agit selon divers mécanismes d'action menant aux dommages tissulaires (PENG et al., 1990). La localisation du PS est le principal facteur influençant le type de mécanisme impliqué dans l'action anti-tumorale de la TPD. Dépendamment de la structure chimique du PS, plus précisément de sa nature hydrophile, lipophile ou

amphiphile, sa distribution tissulaire sera différente. Vu la localisation changeante des PS, les cibles varieront selon les protocoles utilisés.

Lorsque le PS est amphiphile ou lipophile, tel que le Photofrin[®], il sera préférentiellement transporté par des lipoprotéines (LDL) jusqu'aux cellules tumorales. Grâce aux récepteurs-LDL surexprimés dans les cellules cancéreuses, le PS pourra pénétrer dans la cellule via l'internalisation du récepteur lors de la liaison des LDL (ALLISON et al., 1994; MAZIERE et al., 1991; SONCIN et al., 1995). Un plus faible pH, généralement retrouvé dans les tissus tumoraux, joue aussi un rôle dans l'augmentation de la captation cellulaire aux éléments ambiants (POTTIER et KENNEDY, 1990). Une fois dans les cellules tumorales, le PS peut aller se localiser à plusieurs endroits, mais les lysosomes, les mitochondries et les membranes des structures demeurent les sites les plus courants. La production d'oxygène singulet dans la cellule entraîne l'oxydation des composantes lipidiques et protéiques. Du même coup, une altération de la perméabilité et de la fluidité membranaire est provoquée tout comme une inactivation du fonctionnement des enzymes et des récepteurs positionnés sur ces membranes. Pour les PS localisés dans les lysosomes, l'excitation lumineuse cause leur éclatement, dispersant le PS, disponible pour la réaction photochimique, dans le milieu intracellulaire, les autres organelles et les mitochondries (MOAN et al., 1989 ; HSI et al, 1999 ; MACDONALD et DOUGHERTY, 2001). La destruction des mitochondries est particulièrement importante, puisqu'elle entraîne la libération du cytochrome c qui est un activateur de l'apoptose (KROEMER et al., 1997; LIU et al., 1996).

Dans le cas des PS hydrophiles, ils sont plutôt transportés par les protéines sériques d'albumine dans la vascularisation et s'accumulent dans les espaces interstitiels et le stroma vasculaire de la tumeur (KESSEL et al., 1997; MAZIERE et al., 1991). D'ailleurs, une pauvre vascularisation et un drainage lymphatique diminué augmenterait l'accumulation de PS dans l'environnement tumoral (POTTIER et KENNEDY, 1990). Dans ce cas-ci, les dommages induits par les espèces réactives (ROS) visent l'endothélium de la vascularisation tumorale. Ce sont les cellules endothéliales qui seront détruites créant une situation similaire à une réaction inflammatoire observée lors d'une infection ou d'un dommage tissulaire. En effet, suite à la destruction de la vascularisation, des agents inflammatoires et vasoactifs tels que des eicosanoïdes, des thromboxanes, des leukotriènes, des cytokines et de l'histamine seront relâchés dans l'organisme (KORBELIK, 1996). La réaction débute par une vasoconstriction transitoire, suivi d'une vasodilatation et d'une éventuelle stase vasculaire puis d'une hémorragie (FINGAR et HENDERSON, 1987 ; HENDERSON et DOUDHERTY, 1992). Les conséquences de la destruction du microenvironnement sont sévères pour la tumeur. Une réduction du flot sanguin oxygéné et une induction de l'hypoxie dans les cellules tumorales sont détectables dès les premières minutes de l'illumination. Ces deux effets augmentent d'ailleurs avec le temps, appauvrissant la tumeur en nutriments et en oxygène, ce qui mène à l'hypoxie complète et ultimement à la régression complète de la tumeur (STAR et al., 1986; FINGAR et HENDERSON, 1987). Ce type de mécanisme d'action est présenté comme étant indirect, puisque la mort des cellules cancéreuses a lieu suivant des dommages faits à la vascularisation nécessaire à la survie cellulaire (OLEINICK et EVANS, 1998).

Une réaction inflammatoire est aussi observée suivant le traitement à la TPD et est due à la réaction immunitaire. En effet, suivant les dommages cellulaires et vasculaires, il y a signalement de l'inflammation et recrutement des leucocytes. Chez des modèles de rats, une invasion massive de neutrophiles, de macrophages, de monocytes et de mastocytes a été observée pendant et après la TPD (GOLLNICK et al., 1997; KROSL et al., 1995). Les neutrophiles sont impliqués dans les dommages au niveau de l'endothélium et dans la destruction de l'extravasation tumorale. La dégranulation des neutrophiles circulant dans le milieu libère de l'oxygène radicalaire, de la peroxydase leucocytaire, et des enzymes lysosomiales agissant sur la destruction des protéines présentes, ce qui cause globalement des dommages considérables au tissu cible. Finalement, les neutrophiles relâchent des substances chimiotactiques pour le recrutement de cellules du système immunitaire (GALLIN, 1989). L'activité anti-tumorale des macrophages et des monocytes est de son côté aussi stimulée par la TPD. Le relâchement de TNF- α par les macrophages a été observé suivant le traitement (GALLIN, 1989 ; YAMAMOTO et al., 1992 ; QUIN et al., 1993 ; KORBELIK et KROSL, 1994). La réaction immunitaire des cellules affligées par la TPD joue un rôle des plus importants dans la réponse au traitement. De cette réaction, la phagocytose des cellules endommagées par les macrophages est la première étape de la réponse. Vient ensuite l'activation des lymphocytes T grâce à l'inflammation produite suite au traitement via les cellules présentatrices d'antigènes. Même si la TPD est un traitement ciblant une région précise, les effets systémiques inflammatoires et immunitaires ne sont pas limités seulement à cette région et peuvent être disséminés à d'autres sites, par exemple où sont situées des lésions métastatiques (KORBELIK, 1996). Conséquemment à ces effets, la TPD pourrait être notamment potentialisée par une combinaison de protocoles variés d'immunothérapie.

2 -Tomographie d'émission par positrons (TEP)

2.1- Principe général de la TEP

La tomographie d'émission par positrons est une technique basée sur l'imagerie des processus biologiques *in vivo* (SCHIEPERS et HOH, 1998). Elle utilise des molécules radiomarquées permettant d'imager les interactions au niveau de plusieurs processus biologiques qui se produisent dans l'organisme, tout comme les sciences pharmaceutiques utilisent des molécules pour qu'elles agissent de façon thérapeutique sur divers processus biologiques (PHELPS, 2000). Cette technologie nécessite d'abord la production de radioisotopes émetteurs de positrons (β^+) par le bombardement de cibles spécifiques d'éléments stables à l'aide de protons ou de deutons accélérés à des énergies variables de l'ordre du MeV. Chaque fois qu'il y a une désintégration du radioisotope, il y a émission d'un positron (β^+) et d'un neutrino (ν) qui se partagent l'énergie d'émission. Le positron émis du noyau parcourt quelques millimètres dans le tissu, en dispersant son énergie cinétique pour s'annihiler finalement avec un électron du milieu environnant. L'annihilation de ces deux particules émet simultanément deux photons de 511 keV à 180° l'un de l'autre (Fig. 4). Cette émission de photons est indépendante du radionucléide utilisé, rendant impossible l'utilisation contiguë de deux émetteurs de positrons. Puisque le rayonnement d'annihilation est émis au point d'arrêt du positron et non à la position de désintégration du radionucléide, la localisation de la cible présente une incertitude qui dépend de l'énergie cinétique initiale du positron (LECOMTE et al., 2002 ; CHERRY et GAMBHIR, 2001).

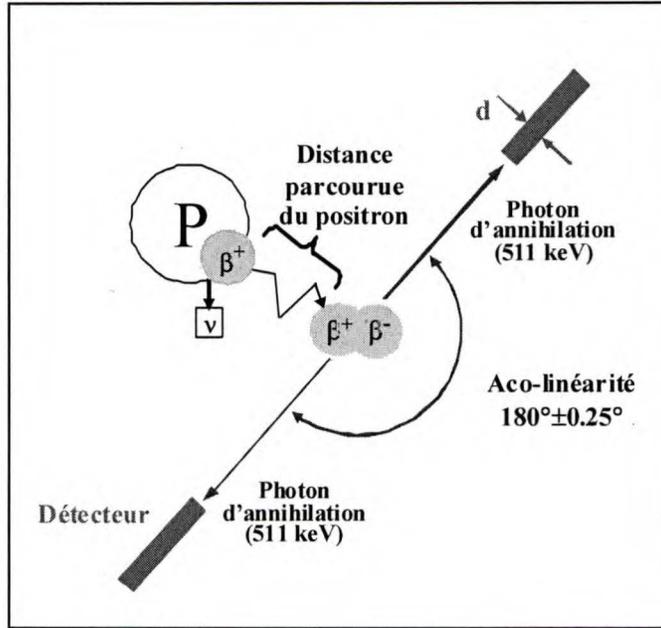


Fig. 4 Émission du positron associé au principe de la TEP

Le radioisotope émet un positron (β^+) qui s'annihile avec un électron du milieu (β^-) créant ensuite deux photons d'annihilation émis en directions opposées. Ces photons sont ensuite détectés via l'anneau de détecteurs du système d'imagerie (d).

(LECOMTE et al., 2002)

2.2-Les radiotraceurs utilisés en TEP

Les principaux radionucléides émetteurs de positrons utilisés, en recherche et en médecine nucléaire, sont le fluor-18 ($t_{1/2} = 109.8$ min), l'azote-13 ($t_{1/2} = 10$ min), l'oxygène-15 ($t_{1/2} = 2.03$ min), le carbone-11 ($t_{1/2} = 20$ min) et le cuivre-64 ($t_{1/2} = 12.8$ h) (LECOMTE et al., 2002 ; CHERRY et GAMBHIR, 2001). En imagerie TEP clinique, le fluor-18 est le principal radionucléide utilisé en raison de sa disponibilité et de sa demi-vie relativement longue facilitant les études. Par contre, du côté de la recherche, l'utilisation de l'azote-13, du cuivre-64 et du carbone-11 permettent d'obtenir une plus grande variété d'informations. Le Tableau 1 présente plusieurs radiotraceurs et leurs applications en imagerie TEP oncologique. L'évaluation du métabolisme du glucose, de

la prolifération cellulaire, de la synthèse d'ADN, de la présence de récepteurs à l'œstrogène, du métabolisme des acides aminés et de la perfusion sanguine peut être effectuée grâce à ces nombreux radiotraceurs (LECOMTE et al., 2002).

Tableau 1- Radiotraceurs couramment utilisés au cours des études TEP en oncologie

<i>RADIOTRACEURS</i>	<i>APPLICATIONS</i>
[¹⁸F]-Fluorodéoxyglucose (FDG)	Métabolisme du glucose
[¹⁸F]-Fluorothymidine (FLT)	Prolifération cellulaire / Synthèse d'ADN
[¹⁸F]-Fluorure	Remodelage osseux
[¹³N]-NH₃, [¹⁵O]-H₂O	Perfusion sanguine
[¹⁸F]-Fluoromisonidazole (FMISO)	Hypoxie
[¹⁸F]-Fluoroestradiol (FES)	Cancer du sein, liaison aux récepteurs de l'œstrogène
[¹¹C]-C-Acétate, [¹¹C]-Acétoacétate	Cancer de la prostate, métabolisme des corps cétoniques

(Tableau modifié de LECOMTE et al., 2002, AUTHIER et al., 2008)

2.3- Applications de l'imagerie TEP

La tomographie d'émission par positrons possède plusieurs applications en recherche tout comme en clinique dans des domaines variés. La détection de tumeurs cancéreuses par la mesure du métabolisme tumoral demeure cependant la première utilisation de l'imagerie TEP. Le processus d'acquisition dynamique permettant d'obtenir des images tomographiques évoluant dans le temps, fournit des informations *in vivo* sur l'évolution et la réaction physiologique, biochimique et métabolique des cellules ciblées par le radiotraceur utilisé. Suite à l'administration du traceur, l'analyse d'images permettra de

donner des informations différentes et complémentaires. À ce jour, il est possible grâce à des modèles mathématiques, de décrire la cinétique des radiotraceurs, ainsi que d'en extraire des paramètres physiologiques et biologiques tels que la consommation d'oxygène, l'utilisation du glucose, le taux de synthèse d'ADN, le taux d'occupation de récepteurs et la perfusion sanguine. Il est aussi possible de détecter l'expression de gènes (WU et al, 2002) ainsi que la distribution d'antigènes en utilisant des anticorps radiomarqués (SUNDARESAN et al., 2003). Malgré sa grande sensibilité, cette modalité d'imagerie offre une résolution spatiale limitée et peu ou pas de références anatomiques. Il est donc primordial, lorsqu'il s'agit de localiser des tumeurs ou d'interpréter les résultats des régions d'intérêt de coupler la TEP à d'autres modalités d'imagerie anatomique. En clinique, l'usage de la tomodesitométrie (TDM) est courant lors des examens TEP. L'imagerie par résonance magnétique apporte elle aussi des informations anatomiques complémentaires non négligeables, mais aussi sur des paramètres physiologiques tels que l'état de la vascularisation et de l'inflammation. Cette combinaison de technique d'imagerie permet de faciliter l'interprétation des données obtenues avec la TEP grâce à des images anato-moléculaires. Le domaine de la recherche utilise d'ailleurs ces mêmes combinaisons d'imagerie afin d'investiguer de façon non invasive plusieurs pathologies. Tout dépendant de l'information désirée, différents protocoles TEP seront utilisés. En effet, une injection en bolus de radiotraceur suivi d'une période d'attente avant la séance d'imagerie ne fournira pas la même information que le suivi dynamique du radiotraceur ou qu'une infusion continue de radiotraceur. L'injection en bolus nous informe sur l'état à un temps donné des cellules ciblées par le radiotraceur choisi. L'infusion continue de radiotraceur, quant à elle, permet de détecter les changements métaboliques en temps réel et d'observer les changements transitoires très

rapides des cellules rendant l'analyse complètement différente des résultats obtenus avec une injection en bolus. Ainsi, il est possible de suivre la réponse tumorale pendant et suivant un traitement anti-cancéreux, de déterminer l'existence de métastases ou tout simplement de localiser une tumeur et de caractériser cette tumeur. La TEP en oncologie est donc très avantageuse puisqu'elle permet de visualiser rapidement l'échec ou la réussite d'un traitement, car les changements physiologiques et métaboliques sont précurseurs à une réponse tumorale (LECOMTE et al., 2002).

2.4- Le métabolisme tumoral

Il existe plusieurs indicateurs permettant d'observer la prolifération anormale des cellules cancéreuses. L'augmentation du métabolisme du glucose ou des acides aminés, de la synthèse protéique ou d'ADN et le remodelage osseux dans le cas des métastases sont des paramètres importants en oncologie pouvant être évalués en imagerie TEP (LECOMTE et al., 2002).

Le 2-déoxy-2-[¹⁸F]-fluoro-D-glucose (FDG) est le radiotracteur utilisé pour évaluer le métabolisme du glucose dans les cellules. Le FDG est un analogue du glucose, ayant subi une modification chimique suite au marquage avec le ¹⁸F, qui est capté par toutes les cellules vivantes, mais préférentiellement par les cellules cancéreuses métaboliquement suractives. Le glucose est naturellement la source d'énergie des cellules et il est transporté à travers les capillaires et la membrane cellulaire via les protéines transportant le glucose (GLUT). Chez les cellules tumorales, étant donné que le métabolisme est anormalement élevé, les protéines GLUT sont surexprimées et l'entrée de glucose dans la cellule s'en

trouve aussi augmentée (BELL et al., 1990). Une fois transporté dans la cellule, le glucose est phosphorylé par l'hexokinase pour devenir du glucose-6-phosphate et ensuite continuer dans la chaîne glycolytique. L'utilisation du FDG devient très utile dans ce cas, puisque ce radiotracteur est une molécule analogue de glucose où le groupement OH en 2' est remplacé par du ^{18}F (Fig. 5A). Cet analogue se comporte de la même façon que le glucose au niveau de sa captation par les cellules. Cependant, lorsqu'il est transformé en FDG-6-phosphate, il est bloqué dans la chaîne glycolytique puisque cette molécule n'est pas un substrat pour les réactions subséquentes et n'est que faiblement déphosphorylé. Le FDG s'accumule donc dans les cellules ayant un besoin en glucose plus élevé, i.e. un métabolisme plus rapide, et devient ainsi un marqueur très efficace pour détecter les cellules dont l'activité de prolifération est élevée (LECOMTE et al., 2002). Le FDG est à ce jour le radiotracteur le plus couramment utilisé en oncologie vu son efficacité reconnue en détection du cancer et pour déterminer la réponse tumorale à un traitement afin de mieux diriger l'approche thérapeutique pour une grande variété de cancers (RIGO et al., 1996).

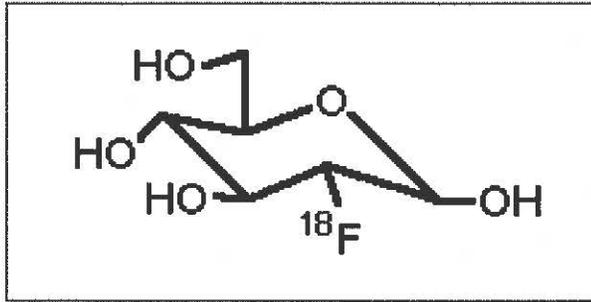


Fig. 5A Structure chimique du 2-déoxy-2- ^{18}F -fluoro-D-glucose

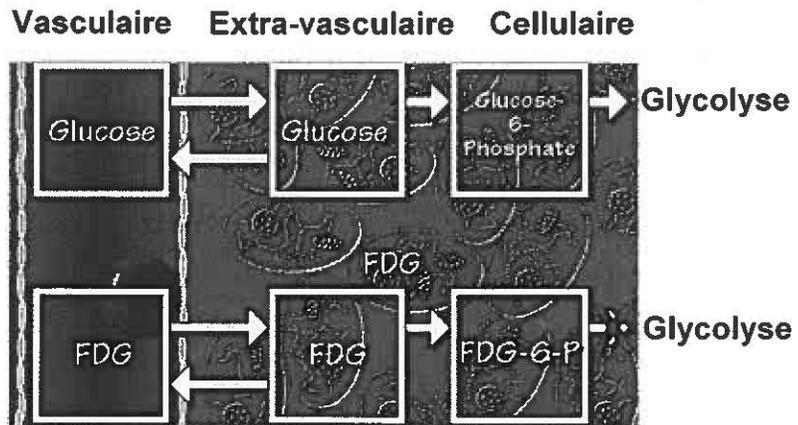


Fig. 5B Représentation schématique de la cinétique du FDG dans les tissus

Le glucose et le FDG sont transportés via la vascularisation dans tout l'organisme et ils passent ensuite dans le milieu extra-cellulaire pour finalement être transportés dans la cellule où ils sont phosphorylés par l'enzyme hexokinase. Par contre, seul le glucose-6-P peut être métabolisé grâce aux étapes subséquentes de la glycolyse. Le FDG-6-P, quant à lui, demeure emprisonné dans la cellule.

Image modifiée de

www.crump.ucla.edu/software/lpp/tracermodeling/lggifs/fdgmoddetail.html

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les méthodes et le modèle animal utilisés dans les recherches présentées dans ce mémoire font suite aux travaux déjà amorcés par Mme Véronique Bérard (BERARD et al., 2006). L'utilisation d'un modèle de rat ayant 2 tumeurs au niveau axillaire provient de l'élaboration extensive du protocole d'imagerie de Mme Bérard. Cette méthode a été jugée, suite à plusieurs expérimentations, la plus appropriée pour obtenir des images pouvant être analysées et pour diminuer le taux de mortalité des animaux durant la procédure d'imagerie en temps réel. L'utilisation de la souris et des rats est largement utilisée dans les études de TPD du cancer *in vivo* (KIM et al., 2009 ; BYRNE et al., 2009), mais le rat a été préféré dans ces recherches vu sa capacité à tolérer de longues périodes d'anesthésie et le haut succès dans la qualité des images obtenues.

1-Culture cellulaire

Le modèle tumoral a été obtenu grâce à la culture de cellules d'adénocarcinome mammaire (MAC) de rat 13762 MAT B III obtenues d'American Type Culture Collection (ATCC). Elles ont été premièrement mises en culture cellulaire dans un milieu EMEM (ATCC) enrichi avec 10% de FBS et avec 5% d'un mélange de pénicilline/streptavidine. Lorsque le nombre voulu de cellules a été atteint, elles ont été congelées à -80°C dans le milieu de culture EMEM contenant 5% de diméthylsulfoxyde

(DMSO) pour un usage futur. Contrairement aux méthodes habituelles de culture cellulaire, la prolifération et la croissance des cellules MAC se sont produites *in vivo* chez des rats femelles Fischer. En effet, 2 injections contenant 5×10^6 cellules et 0.5 ml de saline (volume total d'injection 0.85 ml) ont été administrées de façon intra-péritonéale de part et d'autre de l'abdomen du rat. Après 5 à 8 jours de croissance, les rats injectés avec le mélange de saline et de cellules ont été euthanasiés et leur abdomen a été ouvert afin de récolter les ascites de cellules produites. Les ascites des rats ayant subi une hémorragie interne suite à l'intervention n'ont pas été récoltés (liquide de couleur rouge très prononcé). Le mélange ainsi récolté a ensuite été centrifugé à 3500 rpm pendant 5 min à 4°C afin de séparer les cellules sanguines des cellules tumorales. Le surnageant a ensuite été enlevé tout comme les cellules amassées sur la couche supérieure. Par la suite, le culot a été lavé 2 fois avec du PBS 1X et recentrifugé à 3500 rpm pendant 5 min à 4°C (cette étape a été recommencée 2 à 3 fois par la suite afin d'éliminer toute trace de cellules sanguines). Afin de s'assurer de l'intégrité et de la nature des cellules restantes, 2 échantillons ont été examinés au microscope. Finalement, les cellules ont été congelées à -80 °C à une concentration finale de $2,5 \times 10^7$ cellules / ml dans un mélange de milieu de culture EMEM (95%) et DMSO (5%). La méthode d'expansion tumorale *in vivo* a été privilégiée, puisque la culture de ces cellules se fait en suspension ou de façon semi-adhérente et qu'il était difficile d'obtenir les quantités nécessaires aux grands nombre d'implantation chez les rats. La technique *in vivo* permet d'obtenir rapidement et facilement des modèles tumoraux d'un diamètre voulu.

2-Modèle animal

Des rats femelles Fischer de 150-200 g ont reçus, de chaque côté au niveau axillaire, une injection intra-dermique de 0.35 ml contenant 5×10^6 cellules MAC afin d'obtenir des tumeurs de 8 à 12 mm de diamètre après 5 à 7 jours de croissance. La taille des tumeurs ne devait pas dépasser 12 mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur pour être traitable à la TPD et pour éviter la présence de régions hypoxiques ou nécrosées au centre de la tumeur. Dans tous les cas, les tumeurs traitées avait une tumeur contrôle de taille similaire, ne variant pas plus de 2 mm de diamètre. Toutes les manipulations ont été approuvées par le Conseil Canadien de Protection des Animaux et par le Comité d'éthique de l'expérimentation animale de l'établissement de recherche. Les animaux avaient, en tout temps, accès à de la nourriture et de l'eau, sauf pour une période de 12 h avant la période d'imagerie TEP où les rats devaient être à jeun.

3- Photosensibilisateur

Le Photofrin[®] (Axcan Pharma) a été reconstitué dans du dextrose 5% stérile selon les recommandations du fabricant. Une dose de $5 \mu\text{mol} / \text{kg}$ (comparativement à 2 mg/kg utilisé cliniquement), diluée dans un volume de 1.5 à 2 ml (suivant la recommandation d'injection intra-veineuse chez un rat de $1 \text{ ml}/100 \text{ g}$), a été administrée à l'aide d'une canule via la veine caudale des rats 24 h avant la période d'imagerie planifiée (BUSCH 2006). Le spectre d'absorption lumineuse du PS a permis de s'assurer que le produit n'avait pas été dégradé avec le temps (vérification que le produit a retenu la lumière absorbée à 635 nm et qu'il présente aussi tous les autres pics d'absorption qui lui sont

spécifiques). Dans le cas des rats contrôles pour le PS, un volume identique de dextrose 5% a été injecté 24 h avant la période d'imagerie.

4-Protocole d'expérimentation TPD

La variation de l'illumination est le point ciblé de ce protocole de recherche. Pour ce faire, une des 2 tumeurs est masquée de la lumière grâce à un carton opaque couvrant entièrement la tumeur. Un laser à fibre optique fournit un rayon focalisé couvrant la surface totale de la tumeur grâce à une lentille ajustable. Les taux de fluence de 25, 50, 100, 150 et 200 mW/cm² ont été étudiés. Le temps d'illumination est constant à 33 min 20s et l'angle de l'illumination ne varie pas grâce au cadre solide entourant le lit contenant le rat durant la période d'imagerie. Le rat est positionné sur le dos dans un lit fournissant de l'air chauffé, permettant le maintien adéquat de la température de l'animal. Chaque taux de fluence a été testé sur 5 rats sauf pour 50 mW/cm² où le groupe comprend 8 rats. Des contrôles où l'injection de PS sans illumination (3 rats) ou l'illumination d'une tumeur sans administration de PS ont été faits (3 rats).

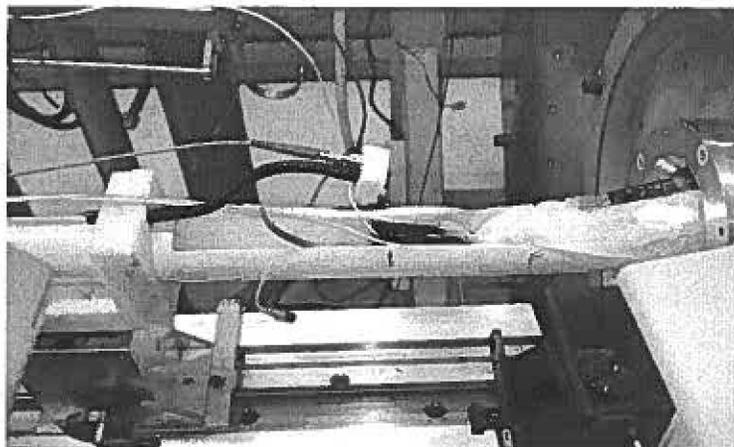


Fig. 6 Rat en position dorsale sur le lit d'acquisition d'imagerie TEP
Exemple de l'illumination de la tumeur gauche (tumeur droite masquée). Le rat est ainsi positionné de la même façon, mais au centre du champ de vue de l'appareil TEP lors de la période d'imagerie en temps réel.

5-Imagerie TEP

La période d'imagerie TEP en temps réel consiste en une acquisition dynamique de 7200s centrée sur la région axillaire du rat où les tumeurs sont situées. Le rat est positionné sur le dos avec les épaules légèrement relevées afin de bien cibler les tumeurs avec le laser situé à l'extérieur du tomographe. Le début de l'acquisition est synchronisé avec une infusion continue de FDG à 0.008 ml / min qui durera pendant toute l'acquisition. L'infusion du FDG est possible grâce à l'installation d'une canule dans la veine caudale du rat. Durant toute la période d'imagerie, l'animal est anesthésié (isoflurane 2%) et les signes vitaux sont observés afin de s'assurer de la bonne condition de l'animal. Trente minutes après le début de l'acquisition et de l'infusion de FDG, la tumeur à traiter est illuminée par le laser pour une période de 2000s. L'imagerie des tumeurs et l'infusion continue de FDG est poursuivie durant la thérapie photodynamique et après celle-ci pour une période totale de 2 h (Fig. 7).

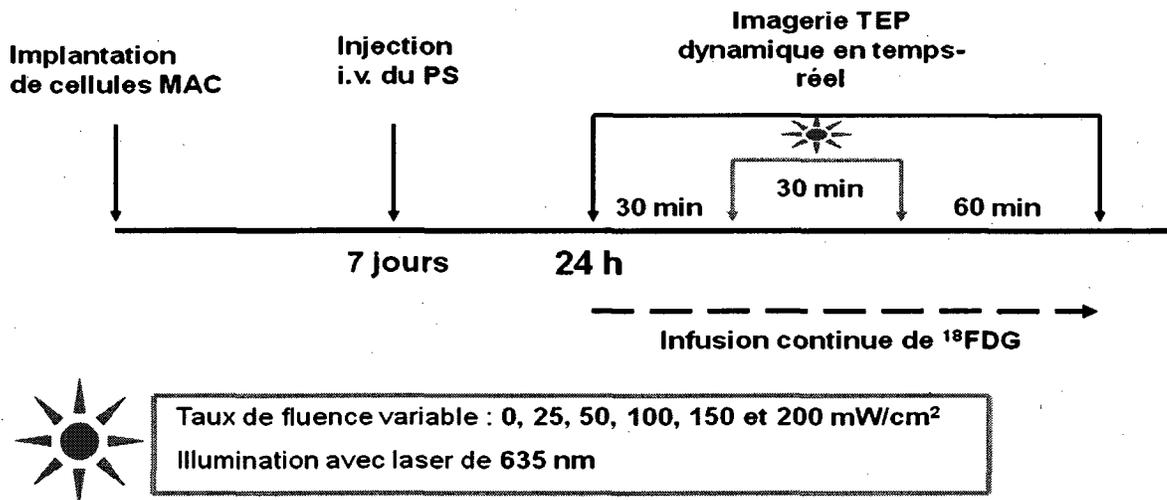


Fig. 7 Protocole expérimental de l'imagerie TEP en temps réel de la TPD

5.1- Appareil TEP dédié aux petits animaux de Sherbrooke

L'appareil TEP utilisé pour toutes ces expérimentations est un tomographe dédié entièrement à la recherche sur petits animaux. Il est composé de 2 anneaux de détecteurs à base de photodiodes à avalanche couplés à des cristaux LYSO et BGO. L'appareil permet l'acquisition d'images qui sont disponibles en 3 coupes distinctes : transaxiale, sagittale et longitudinale. Le champs de vue axial est de 2 cm.

5.2- Reconstruction de l'image

Les images obtenues suite à la période d'imagerie ont été reconstruites selon une méthode itérative MLEM (maximum-likelihood expectation maximization). Pour chaque minute de l'acquisition, une image composée de 9 coupes a été formée, créant ainsi une série dynamique de 120 images pour chaque expérimentation.

5.3- Analyse des images

Des régions d'intérêt ont été tracées sur les tumeurs contrôle et traitée sur la dernière image (i.e. à la 120^e min) et elles ont été ensuite appliquées sur toutes les images précédentes de l'acquisition. L'activité de ces régions d'intérêt a ensuite été corrigée pour la décroissance radioactive durant l'acquisition. Des courbes d'activité corrigées en fonction du temps ont ensuite été générées pour chaque tumeur. De ces courbes, 3 droites de régression linéaire ont été tracées de manière à minimiser l'erreur quadratique et à déterminer 3 étapes distinctes durant la procédure de TPD en temps réel : 1- avant la TPD, 2- durant la TPD et 3- après la TPD. Dans chaque cas, les points étaient considérés

à partir de la 20^e minute (moment fixé arbitrairement où l'animal est stable physiologiquement et où on peut s'assurer que l'infusion fonctionne normalement). Un script écrit pour le logiciel MATLAB permettait ensuite de déterminer les points dans le temps où il y a un changement de pente (i.e. 3 points consécutifs qui ne suivent pas la même pente que les points précédents). Ensuite, à partir de ces courbes il est possible de déterminer leurs pentes (pentes 1, 2 et 3). Ces pentes représentent les taux de captation du FDG en temps réel lorsqu'un régime continu a été atteint, soit environ 10 minutes après le début de l'infusion, après un délai $\Delta 1$ suivant le début de l'illumination et après un délai $\Delta 2$ suivant la fin de l'illumination. Ces délais représentent respectivement le temps nécessaire pour qu'il y ait une réponse métabolique au traitement ($\Delta 1$) et le temps pour que la captation tumorale en FDG soit restaurée suite au traitement ($\Delta 2$). Il est donc ainsi possible de faire une analyse en 5 paramètres des courbes temps-activité (Fig. 8)

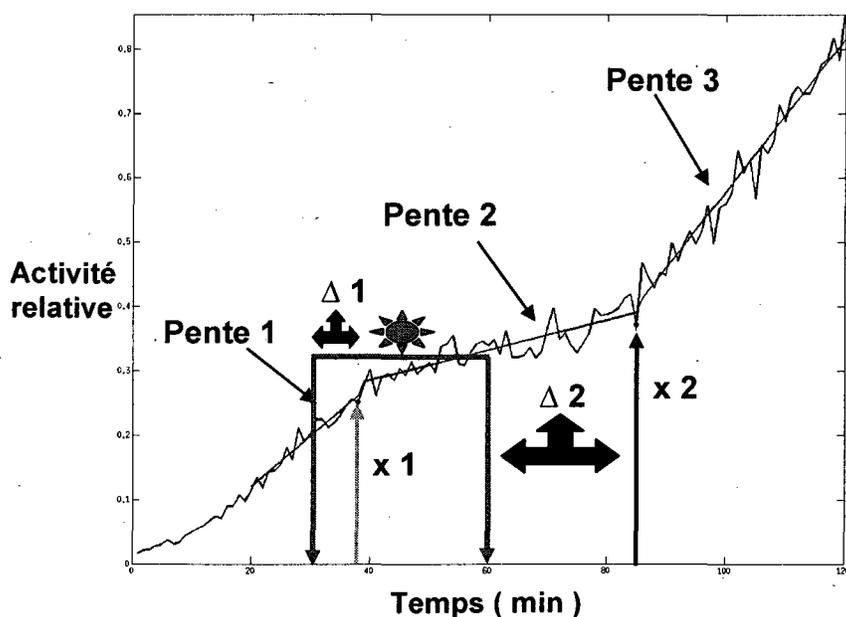


Fig. 8 Schéma des 5 paramètres analysés sur la courbe d'activité en fonction du temps de la tumeur traitée à la TPD.

5.4- Analyse statistique

Les valeurs des 5 paramètres sont exprimées sous forme de moyenne avec leur écart-type pour tous les sujets du groupe. L'analyse de la variance selon la méthode ANOVA a été appliquée afin de déterminer si la différence entre les groupes de taux de fluence était significative ($p < 0.05$).

6- Imagerie TEP / IRM

Le protocole combinant les acquisitions non-simultanées de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de l'imagerie TEP n'est ici que présenté sommairement, puisqu'à l'écriture de ce mémoire il était toujours en cours d'élaboration et d'amélioration. Une acquisition d'IRM (7 Tesla, Varian) de 60 minutes est effectuée avant la TPD (TR : 171 ms, TE : 2,49 ms, Average : 4, Matrix : 128 x 128, champs de vue : 50 x 40 mm²) et une injection intra-veineuse (0.6 ml à 0,6 ml/min) de Gd-DTPA est effectuée à la 5^e minute d'acquisition. La TPD est ensuite effectuée selon le protocole décrit ci-haut. Les périodes d'IRM post-TPD se déroulent de la même façon que la période contrôle précédant la TPD. En imagerie TEP, un bolus d'environ 74 mBq est injecté de façon intra-veineuse, suivi d'une acquisition dynamique de 60 min. Le LabPET™, ayant un champ de vue axial de 4 cm, a été utilisé pour ces essais TEP. Les images obtenues grâce à ces expérimentations TEP ne peuvent être comparées aux images analysées dans ce présent mémoire, puisque le projet d'imagerie en temps réel n'a pas été effectué sur le même appareil et que la qualité des images obtenues n'est aucunement comparable.

RÉSULTATS

1-Taux de captation tumoral du FDG

Grâce au traçage de régions d'intérêt sur les images obtenues (Fig. 9) correspondant aux tumeurs traitées et contrôles, différentes courbes d'activité en temps réel en fonction du temps ont pu être générées selon le taux de fluence appliqué (Fig. 10).

L'analyse en 5 paramètres des courbes de captation tumorale de FDG en temps réel a permis dans un premier temps de déterminer 3 valeurs de pente correspondant à la captation tumorale du FDG en temps réel 1) avant la TPD, 2) pendant l'effet de la TPD et 3) après la TPD et ensuite de quantifier 4) le temps requis pour observer un changement métabolique suite au début du traitement et 5) pour avoir un retour de l'augmentation de la captation tumorale du FDG. Les pentes ont été déterminées grâce à l'ajustement de 3 droites à partir de la 15^e minute jusqu'à la fin de l'acquisition. La valeur de la première pente correspond au taux de métabolisme des tumeurs de la 15^e minute de l'acquisition jusqu'au début de l'effet du traitement. Le début de l'effet du traitement est caractérisé par un changement métabolique de la tumeur traitée, après le début de l'illumination (à partir de la 30^e minute environ). Ce changement métabolique est habituellement observé

par une diminution du taux de captation tumorale du FDG en temps réel (Fig. 10). Ce changement varie en intensité selon le taux de fluence appliqué lors de la TPD.

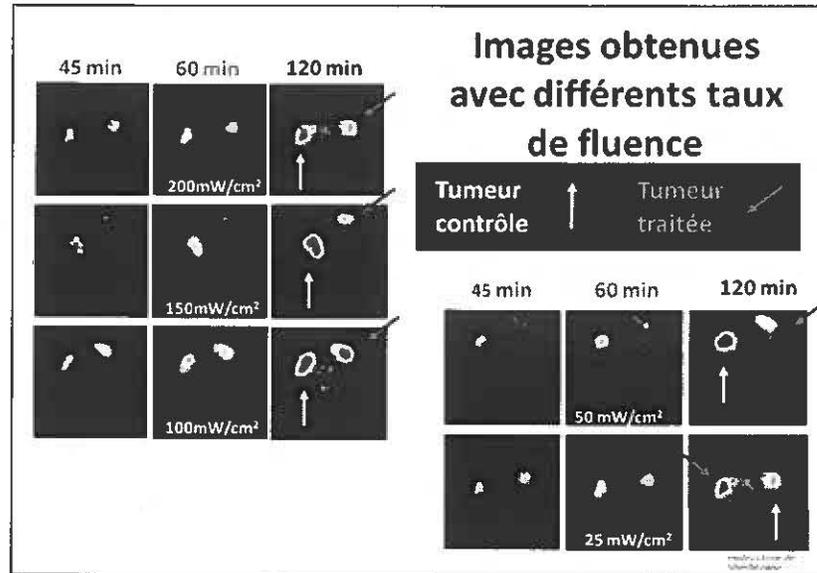


Fig. 9 Activité des tumeurs durant le protocole d'imagerie TEP en temps réel

Images transaxiales des tumeurs traitées (flèches grises) et contrôle (flèches blanches) à différents temps durant le protocole d'imagerie TEP. 45 min : durant la TPD; 60 min : immédiatement après la TPD; et 120 min : à la fin de l'acquisition

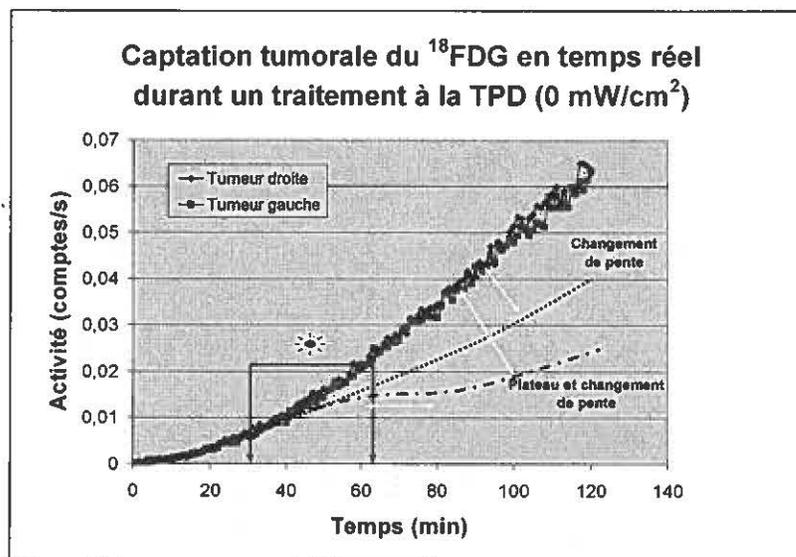


Fig. 10 Graphique de la captation tumorale de FDG selon le temps sans illumination

Exemple des phénomènes observés au niveau de l'activité des tumeurs en fonction du temps. La durée de la TPD est délimitée via les flèches grises. Les deux courbes expérimentales représentent la captation de deux tumeurs contralatérales en l'absence d'illumination (0 mW/cm^2). Les lignes pointillées et en traits représentent deux modifications typiques résultant du traitement TPD. Chaque point des courbes correspond à l'activité de la tumeur pour une période de 60 s.

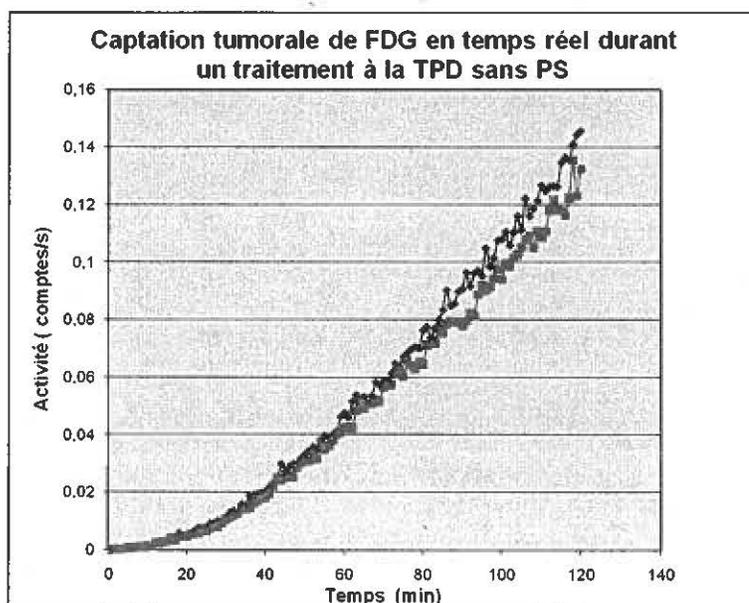


Fig. 11 Graphique de la captation tumorale de FDG en temps réel avec illumination, mais sans administration de PS

Les deux courbes expérimentales représentent la captation de deux tumeurs contralatérales ayant seulement reçu l'illumination à 200 mW/cm^2 . La courbe noire correspond à la tumeur droite et la courbe grise à la tumeur gauche (illuminée). Chaque point des courbes correspond à l'activité de la tumeur pour une période de 60 s.

Globalement, le taux de captation tumoral de FDG suit un modèle comprenant 3 paramètres : 1) une première droite croissante de la 15^e minute de l'acquisition jusqu'à quelques minutes suivant le début de l'illumination, 2) une deuxième droite avec une pente moins accentuée que la droite 1 suivant le début de la TPD et variable dans sa durée et 3) une troisième droite caractérisant la fin de l'effet métabolique tumoral de la TPD et démontrant un rétablissement du taux de la capture tumorale en FDG. L'analyse de ces 3 courbes et de la valeur de leur pente permet de caractériser le taux de captation tumorale de FDG en temps réel pendant toute l'acquisition et ainsi de comparer l'état métabolique de la tumeur selon le régime d'illumination (Fig. 12). Ainsi, il existe une différence notable dans la réponse métabolique lors d'une illumination à bas ou à haut taux de fluence, ce qui vient soutenir plusieurs hypothèses appuyant l'utilisation de taux de

fluence plus bas afin d'obtenir une meilleure réussite du traitement. Dans le cas des animaux contrôles, l'administration du PS sans illumination, tout comme l'illumination d'une tumeur sans administration de PS ne provoque pas de changement au niveau de la captation tumorale du FDG lorsque les 2 tumeurs sont comparées. Les figures 10 et 11 illustrent ainsi ces 2 conditions contrôles. La Figure 12 présente les valeurs des taux de captation de FDG (valeurs des pentes selon l'analyse en 5 paramètres) pour les tumeurs traitées à la TPD selon différents taux de fluence.

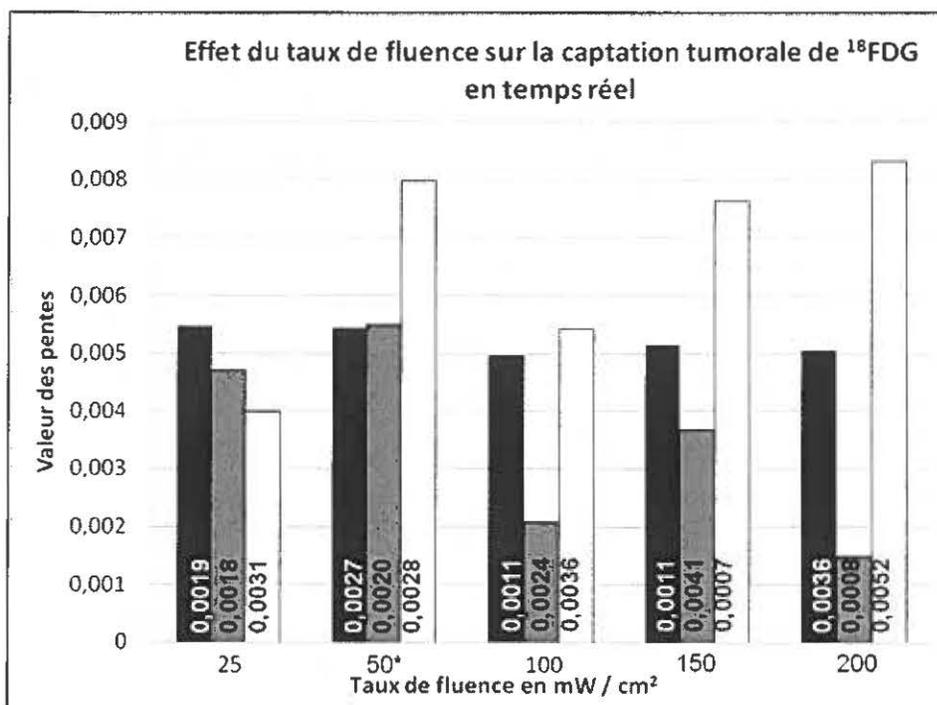


Fig. 12 Taux de captation tumoral du FDG (comptes/pixel /min) avant, pendant et après la TPD selon différents taux de fluence.

La pente 1 : temps avant la TPD, **pente 2** : pendant l'effet de la TPD, **pente 3** : après la TPD. N = 5 rats, * : N = 8 rats pour 50 mW/cm². Les valeurs inscrites à l'intérieur des colonnes correspondent à la valeur de l'écart-type.

Les pentes 3 ne sont pas significatives car la valeur de $p > 0.05$ pour la variation entre les groupes.

Tout d'abord, la valeur de la pente 1 se maintient à un niveau comparable pour chacun des groupes. Si les taux de fluence sont classés en 2 catégories, bas (25 et 50 mW/cm²) et hauts taux (100 à 200 mW/cm²), il existe une baisse plus importante dans le métabolisme tumoral suivant le début de l'illumination pour des taux de fluence plus élevés. Le groupe des bas taux de fluence, quant à lui ne démontre pas de diminution significative, le taux de captation tumoral de FDG ne variant pas suite à l'illumination. Finalement, suite à la TPD, le métabolisme augmente de nouveau selon la valeur des pentes 3 observées. Tous les taux de fluence appliqués semblent réactiver le métabolisme tumoral post-TPD, sauf pour le groupe de 25 mW/cm² où l'activité métabolique diminue de 27% comparativement à l'activité pré-TPD. À partir de 50 mW/cm², la valeur du taux de captation tumorale de FDG post-TPD augmente en comparaison au taux initial avant le traitement. Ce sont par ailleurs les taux de 50, 150 et 200 mW/cm² qui inscrivent les plus hautes augmentations de métabolisme (de 47 à 64 % d'augmentation par rapport au taux initial de captation du FDG). La variation de métabolisme tumoral durant la séquence : pré-TPD, illumination et période du repos demeure plus importante avec l'application de haut taux de fluence lors de la TPD sur un modèle d'adénocarcinome mammaire selon l'étude des valeurs des pentes obtenues dans ces expérimentations.

Tableau 2 – Valeurs de pentes selon l'analyse en 5 paramètres

Taux de fluence (mW / cm ²)	Valeur de la pente 1 (compte/pixel/ min)	Valeur de la pente 2 (compte/pixel/ min)	Valeur de la pente 3 (compte/pixel/ min)
25	0,0055 ± 0,0019	0,0047 ± 0,0018	0,0040 ± 0,0031
50	0,0054 ± 0,0027	0,0055 ± 0,0020	0,0080 ± 0,0028
100	0,0050 ± 0,0011	0,0021 ± 0,0024	0,0054 ± 0,0036
150	0,0051 ± 0,0011	0,0037 ± 0,0041	0,0076 ± 0,0007
200	0,0051 ± 0,0036	0,0015 ± 0,0008	0,0083 ± 0,0052

2-Délai de réponse et de restauration de la captation tumorale de FDG

Les paramètres 4 et 5 correspondant au temps 4) nécessaire à l'apparition de la diminution du métabolisme ($\Delta 1$) et 5) au retour à la capture grandissante du FDG par la tumeur ($\Delta 2$) ont été obtenus grâce à la caractérisation des segments linéaires sur la courbe de captation tumorale du FDG en fonction du temps (paramètres 1 à 3) (Fig.12). Selon le Tableau 3, les valeurs de $\Delta 1$ observées varient de 11 à 24 min, tandis que celles concernant le $\Delta 2$ se regroupent principalement entre 23 et 29 min si on exclut le temps

exprimé pour un taux de fluence de 150 mW/cm² où le délai observé est de 8 min. Les données rapportées dans ce tableau comportent des écart-types élevés (de 35 à 65% de variation). Les grandes variations observées dans ces résultats rendent ainsi la véracité de l'interprétation contestable.

Tableau 3 – Valeurs des délais $\Delta 1$ et $\Delta 2$

Taux de fluence (mW/cm ²) / Dose totale (J/cm ²)	$\Delta 1$ (min)	$\Delta 2$ (min)	Durée de l'effet du traitement (min)
25 / 50	16,3 ± 9,4	28,5 ± 14,8	45,2 ± 17,5
50* / 100	24,4 ± 12,0	27,4 ± 16,0	36,0 ± 20,0
100 / 200	22,7 ± 10,6	29,3 ± 13,1	39,6 ± 16,9
150 / 300	16,6 ± 8,8	8,8 ± 5,7	25,2 ± 10,5
200 / 400	11,0 ± 3,9	23,0 ± 14,4	45 ± 15,0

N = 5 rats, * : N = 8 rats

La durée de l'effet biologique du traitement (étendue de la droite 2) a été déterminée selon les valeurs de $\Delta 1$ et $\Delta 2$. En effet, le temps auquel la captation tumorale de FDG recommence à augmenter ($\Delta 2$) moins le temps où la réponse métabolique a été observée ($\Delta 1$) correspond à la durée totale de la droite 2. Selon la dernière colonne du Tableau 3, la durée varie de 25 à 45 min selon le taux de fluence utilisé. Bien qu'une tendance vers une

durée plus courte de l'effet métabolique semble se dessiner en augmentant le taux de fluence, cette tendance est perdue au taux de fluence maximum de 200 mW/cm². Il n'existe donc pas de corrélation significative entre l'augmentation ou la diminution du taux de fluence et la durée de l'effet du traitement.

1^{er} résultats préliminaires TEP / IRM

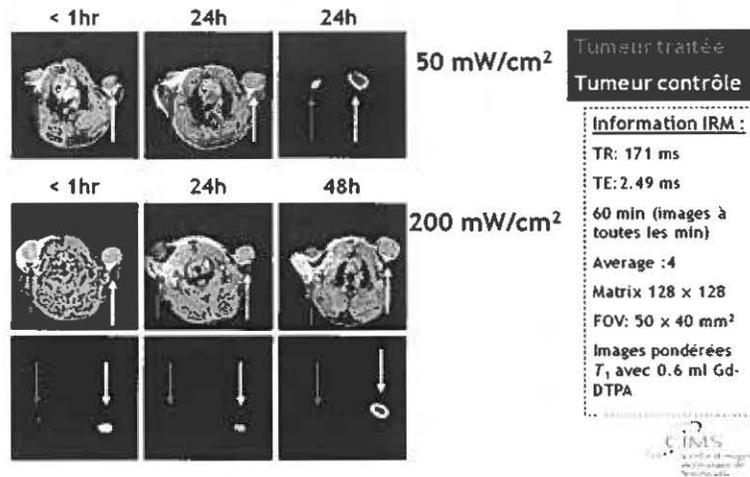


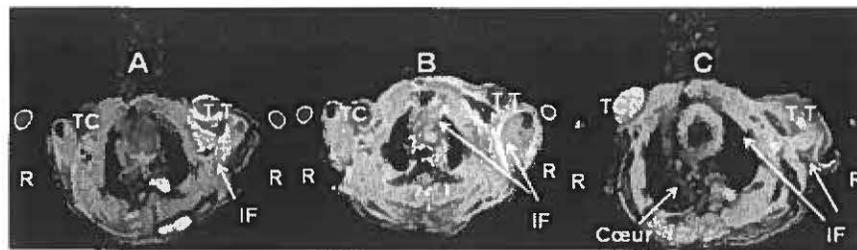
Fig. 13 Images obtenues en TEP et IRM à différents temps post-TPD à 50 et 200 mW/cm².

Les flèches grises identifient la tumeur traitée et les flèches blanches correspondent à la tumeur contrôlée.

3- Expériences préliminaires en imagerie TEP et IRM combinée

Aucune analyse quantitative n'a été effectuée d'après les données obtenues des images de la Figure 13. Ces images ne permettent que de visualiser l'effet au niveau vasculaire et la profondeur de la nécrose (grâce à la zone noire de la tumeur traitée) suite au traitement à la TPD. La Figure 14, quant à elle, offre des informations complémentaires aux résultats obtenus grâce à l'imagerie TEP uniquement. Grâce à ces images de recalage et de fusion, il est possible de voir simultanément les effets métaboliques et vasculaires causés par la TPD à 200 mW/cm² mesurables par ces 2 modalités d'imagerie non-invasives.

Études préliminaires: Recalage et fusion TEP / IRM



Images TEP / IRM d'un rat Fischer portant 2 tumeurs d'adénocarcinome mammaire au niveau axillaire 1 h (A), 24 h (B) and 48 h (C) post-TPD à 200 mW/cm² avec injection de porfimer sodium. TT: tumeur traitée, TC: tumeur contrôlée, R: point de référence, IF: inflammation.

 UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

 CIMS
Centre d'imagerie
médicale et de
biomédecine

Fig. 14 Recalage et fusion manuelle d'images TEP et IRM prises non-simultanément du même animal à différents temps post-TPD

DISCUSSION

La TPD nécessite 3 éléments afin d'obtenir un traitement contre les cellules néoplasiques : un photosensibilisateur, une source lumineuse et de l'oxygène. Dans cette étude, la variation du taux de fluence présente plusieurs aspects intéressants pour une meilleure compréhension du mode d'action de la TPD. D'un côté, il a été rapporté qu'un faible taux de fluence est associé à une diminution des effets secondaires tout en offrant une meilleure efficacité de traitement (HENDERSON et al., 2006). D'un autre côté, l'évaluation du métabolisme tumoral grâce à l'imagerie TEP est une pratique courante et reconnue permettant de suivre la réponse des cellules cancéreuses au traitement administré. Combinées ensemble, les variations de taux de fluence en TPD du cancer et l'imagerie TEP permettent d'obtenir en temps réel la réponse métabolique tumorale. De cette méthode, il est possible d'établir les protocoles d'illumination qui favoriseront une réponse métabolique plus marquée. De plus, il sera possible d'établir le temps nécessaire à cette réponse. Par contre, cette méthode ne permet pas de différencier l'inflammation de l'activité métabolique. Malheureusement, aucun suivi de guérison des tumeurs n'a été effectué car les tumeurs contrôles non-traitées atteignaient rapidement un diamètre supérieur à 12 mm de diamètre après les expérimentations, demandant ainsi que l'animal soit euthanasié avant de pouvoir déterminer si la tumeur avait été traitée complètement. C'est un aspect qui pourrait facilement être exploré en omettant la tumeur contrôle dans

une étude future. Le PS sélectionné pour cette étude (Photofrin®) est le seul produit utilisé au Canada pour traiter certains cancers à la TPD. Ses caractéristiques ont maintes fois été décrites dans plusieurs articles (ALLISON et al., 2004; SIEGEL et al., 1999) et il demeure une référence en matière de PS utilisé en TPD du cancer. Par contre, son mécanisme d'action demeure encore à ce jour complexe et plusieurs études expérimentales fondamentales et précliniques sont en cours afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions impliqués au niveau local et systémique. Il a notamment été question, dans la section introduction de ce mémoire, des récepteurs LDL qui jouait un rôle majeur dans l'internalisation cellulaire du PS, permettant ainsi l'action destructrice tumorale. Le taux d'expression cellulaire de ces récepteurs n'a toutefois pas été identifié dans ces travaux. Une variation entre les tumeurs au niveau du nombre de ces récepteurs peut être plausible et jouerait un facteur clé quant à la réussite de la TPD sur les cellules tumorale puisqu'il ne peut être certain que le PS s'est accumulé dans le milieu cellulaire à tous les traitements de la TPD. L'analyse des résultats présentés se base sur un niveau d'expression des récepteurs LDL surexprimés comme mentionné précédemment (SONCIN et al., 1995) et comparable d'une tumeur à une autre. Une façon simple de vérifier le niveau d'expression global des récepteurs LDL aurait été d'identifier leur niveau sur des cellules monoclonales isolées d'un échantillon sanguin pris immédiatement avant la TPD et de révéler par immunobuvardage les récepteurs présents (PETIT et al., 2007). Une autre méthode plus invasive aurait consisté à prélever la tumeur chez des animaux non-traités et de révéler par immunohistochimie la présence des récepteurs sur des coupes tumorales. Finalement, une meilleure compréhension des effets immédiats permettrait d'identifier rapidement les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire et vasculaire, tout comme l'inflammation et la réponse immunitaire associées à

ce traitement. Comme mentionné précédemment, les effets inflammatoire et immunitaire sont indissociables de l'activité métabolique tumorale. Cependant, ils fournissent une aide dans l'interprétation de la réponse métabolique et soutiennent les résultats observés par d'autres équipes de recherche (KORBELIK, 1996 ; GOLLNICK et al., 1997 ; DOUGHERTY et al., 1998). Ceci suggère d'autres méthodes d'investigation complémentaires aux résultats obtenus dans ce projet de recherche.

1-Métabolisme initial (pente 1)

Étant donné la grande variabilité inter-individu, il est normal de porter une attention plus particulière au métabolisme tumoral initial puisqu'il existe une grande variabilité de la dimension des tumeurs. Par contre, selon les résultats obtenus, pour des tumeurs de volume semblable variant de 8 à 11 mm de diamètre, le niveau de la captation tumorale de FDG demeure à peu près constant. Il est donc possible de comparer tous les animaux entre eux puisqu'ils représentent un modèle reproductible de cancer à métabolisme constant et prévisible. Afin de déterminer la valeur de cette première pente, correspondant au taux de captation tumoral de FDG en temps réel, il a fallu exclure les points des 15 premières minutes puisque ceux-ci représentaient la partie exponentielle de la courbe. Cette partie exponentielle est générée principalement par l'entrée du FDG dans le système et coïncide avec la stabilisation de l'animal suite au début de la procédure. En effet, une variation très importante des signes vitaux tels que la température, la respiration et le rythme cardiaque peut affecter l'entrée de FDG dans les cellules. Il est donc nécessaire d'attendre un état stable de l'animal avant de considérer l'activité mesurée dans la région d'intérêt.

2-Effet métabolique de la TPD (pente 2 et 3)

La technique d'infusion du FDG permet, contrairement à une injection en bolus, de suivre en temps réel l'entrée et la rétention du FDG dans les cellules tumorales. À partir de cette information, il est possible de déterminer un taux de captation du FDG correspondant à l'activité métabolique de la tumeur. Le fractionnement des images en plusieurs points, dans ce cas-ci à chaque minute, fournit cette information dynamique pendant les 120 minutes de la période d'imagerie. Les changements métaboliques transitoires sont ainsi détectables grâce à cette technique. L'application d'un traitement de TPD sur un modèle tumoral vise principalement et ultimement à détruire toutes les cellules cancéreuses en évitant de causer des dommages secondaires aux cellules environnantes. Par contre, cette destruction cellulaire survient selon différents mécanismes d'action dépendamment de divers paramètres, tels que le PS utilisé et sa biodistribution dans le temps, de même que les différents régimes d'illumination employés. Pour ce projet de recherche, le changement métabolique tumoral a été déterminé grâce au traçage de 3 droites linéaires minimisant l'erreur quadratique sur tous les points. Pour déterminer ces 3 droites, plusieurs éléments ont été pris en considérations : 1) chaque droite devait comporter 5 points au minimum (10 points pour la 1^{ère} droite), 2) la première droite devait débiter seulement à partir de la 15^e minute, 3) la 2^e droite ne pouvait débiter avant la 31^e minute, soit après le début du traitement, et 4) la 3^e droite ne pouvait débiter avant la 36^e minute. La pente de ces droites a par la suite été considérée comme reflétant le taux de captation tumorale de FDG en temps réel. Ainsi, il est possible d'isoler l'effet métabolique de la TPD sur la courbe de captation tumorale de FDG en fonction du temps grâce à la droite 2.

Selon les valeurs de la Figure 12 et du Tableau 2, le métabolisme est affecté et diminué pour tous les taux de fluence utilisés sauf pour le groupe de 50 mW/cm². La diminution du taux de captation tumorale de FDG est principalement due aux effets néfastes de la TPD sur les cellules tumorales, ce qui entraîne la réduction en besoin glucidique. Plusieurs dommages induits par la TPD sont possibles pouvant ainsi expliquer la diminution de métabolisme. En effet, la TPD utilisant le Photofrin[®] agit au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et atteint directement les cellules cancéreuses, ciblant principalement les mitochondries (HILF et al., 1984 ; KESSEL, 1984). Dans tous les cas expérimentés dans cette étude, les photons pénétraient jusqu'à environ 5 mm de profondeur, assurant ainsi un traitement total de la tumeur. Durant l'illumination, le PS excité provoque la formation d'oxygène singulet responsable des effets cytotoxiques et cet oxygène singulet peut diffuser jusqu'à 20 nm de son point d'excitation, assurant la localité du traitement (MOOR, 2000). Durant cette phase suivant immédiatement l'illumination, ce ne sont que les effets précoces qu'il est possible d'observer, puisque la réponse à la TPD se poursuit sur plusieurs heures par la suite. Considérant la rapidité à laquelle l'effet métabolique est observé (entre 11 et 24 min après le début de l'illumination), il est possible de restreindre les possibilités quant aux effets pouvant expliquer cette diminution de métabolisme tumoral. Il est possible de classer les effets de la TPD en 4 catégories : 1) cellulaires, 2) vasculaires, 3) immunitaires et 4) inflammatoire. En premier lieu, l'effet de la TPD combinée au Photofrin[®] a été démontré au niveau de la membrane plasmique et de la mitochondrie, étant donné l'accumulation de ce PS à ces 2 constituants cellulaires (HSIEH et al., 2003 ; KESSEL, 1984). En effet, suivant le début de l'illumination, trois phénomènes rapides peuvent expliquer le ralentissement métabolique des cellules observé par l'imagerie TEP en temps réel.

Premièrement, l'activation des caspases via la surexpression rapide du récepteur Fas et de son ligand FasL démontrée rapidement suivant le début de la TPD *in vitro* (AGOSTINI et al., 2004 ; ALMEIDA et al., 2004). Deuxièmement, l'inhibition de certaines enzymes importantes à la production d'ATP (HILF et al., 1984). Troisièmement, le relâchement du cytochrome c dans le cytosol suite à la perte de l'intégrité membranaire mitochondriale (GRANVILLE et al., 1998). Ainsi, la chute du métabolisme démontrée par les valeurs des pentes 2 semble être la démonstration du commencement du mécanisme d'apoptose induit suite à la TPD, et ce quel que soit les différents taux de fluence utilisés.

La photo-oxydation provoquée par l'oxygène singulet au niveau des membranes plasmiques ne semble pas être effective pour provoquer directement la mort cellulaire, mais elle induit une surexpression marquée du récepteur Fas et de FasL, suggérant ainsi une contribution de l'activation des caspases de façon extrinsèque. Cette activation n'étant pas particulièrement énergétique, il n'en résulterait pas une augmentation significative de captation du FDG dans les cellules tumorales. Par contre, s'ensuit le recrutement de la procaspase 8 suivi de son activation par l'auto-clivage. La caspase 8 active ensuite une cascade effectrice de l'apoptose par, entre autre, l'activation de la caspase 3 (Fig. 15). De plus, l'activation de la caspase 8 joue un rôle dans le relâchement du cytochrome c grâce au clivage de Bid (OLEINICK et al., 2002). Par contre, l'implication des récepteurs Fas/FasL semble être secondaire à l'activation de la cascade des caspases mitochondriales et aurait plutôt un effet d'amplification du phénomène et de propagation de l'effet grâce à des signaux autocrines et paracrines (MATROULE et al., 2001 ; GRANVILLE et al., 1998). D'ailleurs, en aucun cas durant ces travaux les statuts de Fas et FasL n'ont été caractérisés, ni connus. Les dommages induits aux mitochondries

sont, quant à eux, responsables d'induire rapidement l'apoptose comparativement aux effets induits sur les autres constituants cellulaires.

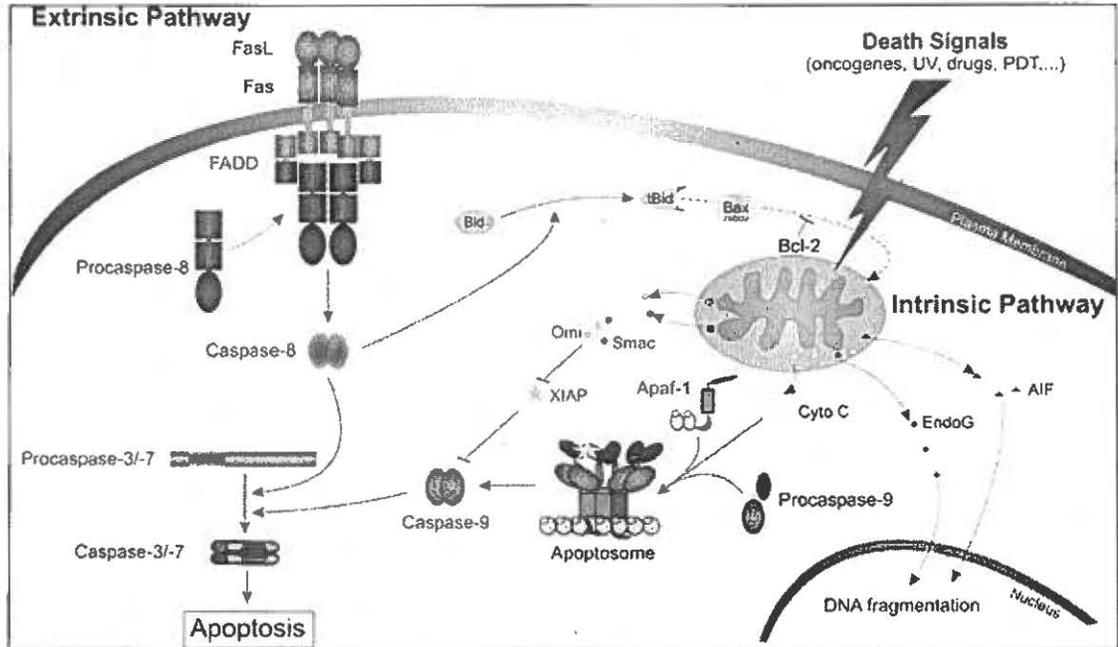


Fig. 15 Cascades extrinsèques et intrinsèques impliquées dans l'activation des caspases et de l'apoptose (AGOSTINIS et al., 2004)

Suite à l'illumination, l'oxygène singlet créé dans les membranes mitochondriales provoque le relâchement du cytochrome c dans le cytosol (GRANVILLE et al., 1998; VARNES et al., 1999 ; KESSEL et LUO, 1999). Suivant ce relâchement, une rapide perte du potentiel membranaire est observable dû à l'ouverture de larges canaux responsables du transport d'ions. L'ouverture de ces canaux provoque la sortie de Ca^{2+} dans le cytosol et peut aussi être impliquée dans le relâchement du cytochrome c. Par contre, cette relation entre l'ouverture des canaux d'ions et le cytochrome c n'est pas encore élucidée et demeure à l'état de supposition. La dépolarisation membranaire mitochondriale affecte le gradient des ions H^+ nécessaire à la production d'énergie grâce à la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, la production normalement obtenue à travers

la chaîne respiratoire de la mitochondrie est rapidement arrêtée et peut influencer la transformation du FDG en glucose-6-phosphate par l'hexokinase, puisqu'elle nécessite une molécule d'ATP. De plus, la majeure partie de la production d'ATP est aussi affectée par l'inhibition, à différents niveaux, d'enzymes impliquées dans le cycle de Krebs. Il a été rapporté en effet que les dérivés hématorporhyriques peuvent inhiber la malate déshydrogénase (15%) et la succinate déshydrogénase (20-25%) dans un modèle *in vivo* (HILF et al., 1984). Vu la subtilité de l'atteinte au niveau de la production de l'ATP, un effet métabolique peu important serait probablement la réponse attendue immédiatement après le début de la TPD. Effectivement, les bas taux de fluence (25 et 50 mW/cm²) affectent légèrement, mais de façon significative, le métabolisme tumoral en premier lieu. Au contraire, les hauts taux de fluence (100 à 200 mW/cm²) provoquent une baisse marquée du métabolisme suite à l'illumination du tissu tumoral. Dans ce deuxième cas, l'effet du traitement se doit d'agir non seulement sur la production de l'ATP, mais aussi à d'autres niveaux, tel que la destruction directe des cellules.

Étant donné la multitude de possibilités concernant les atteintes et les réactions possibles, l'analyse de la troisième partie de la courbe de captation tumorale de FDG en temps réel en fonction du temps devient primordiale. Ainsi, si l'effet métabolique est plus important pour les hauts taux de fluence, l'implication du cycle de Krebs, de la chaîne respiratoire et de l'activation des caspases n'est pas majoritaire, puisque ces dommages ne peuvent pas immédiatement détruire les cellules. Il est donc plausible de considérer d'autres effets lors de l'application de taux de fluence plus élevés. Selon les droites 3 (pente 3), la captation tumorale de FDG subit un regain d'importance de 8 à 23 minutes suivant la fin de l'illumination. Puisque cette résurgence est plus marquée que pour les bas taux de

fluence, il importe alors de s'attarder aux phénomènes pouvant causer cette demande accrue en FDG. Plusieurs réponses aux dommages causés par l'oxygène singulet peuvent générer une demande en glucose. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmé demandant beaucoup d'énergie. L'autophagie est une autre méthode d'auto-destruction de la cellule par ses propres lysosomes qui entraîne une demande énorme en énergie (LIU et al., 2007). Une vasodilatation intense peut aussi provoquer un apport plus important de FDG à la région d'intérêt. Enfin, la mort par nécrose est aussi possible avec la TPD utilisant le Photofrin® puisque celui-ci se localise aussi dans les membranes plasmiques et qu'il a été démontré que ces PS peuvent favoriser la nécrose plutôt que l'apoptose (KESSEL et LUO, 1998). Lors du phénomène de la nécrose dû aux dommages causés aux membranes plasmiques, c'est le bris de la membrane cellulaire qui cause l'effet le plus important de la TPD. En effet, la lyse de la cellule induit la dispersion du contenu intracellulaire dans la région extracellulaire provoquant une réaction inflammatoire et immunitaire pouvant être responsable de la grande quantité de FDG recrutée dans la région de traitement. Finalement, même si la tumeur traitée a dans tous les cas arrêté sa croissance et qu'elle s'est nécrosée, il est possible que certaines parties de la tumeur n'aient pas été traitées ou n'aient été que partiellement traitées en raison de la difficulté de bien positionner le laser sur la tumeur lorsque l'animal est à l'intérieur du tomographe. Ainsi, les cellules qui sont demeurées intactes ou qui n'ont subi que des dommages mineurs continuent leur croissance ou mettent en branle leurs mécanismes de réparation. Dans les deux cas, l'apport en énergie est essentiel. Concernant les valeurs des pentes 3 des taux de fluence de 50, 150 et 200 mW/cm², leur augmentation est de 47, 48 et 64 % respectivement par rapport au taux de captation tumoral de FDG initial. Dans chaque cas, l'hypothèse de l'apoptose doit être retenue puisque ce phénomène peut avoir

été activé principalement par le déclenchement de la cascade des caspases, soit dû à la liaison de FasL à son récepteur, soit au relâchement du cytochrome c dans le cytosol. La demande en énergie du phénomène d'apoptose est facilement explicable par la multitude d'enzymes et de protéines effectrices impliquées dans le processus. En effet, la Figure 15 expose les différentes cascades d'activation des caspases engagées lors d'un traitement à la TPD menant à la fragmentation de l'ADN et à la production de corps apoptotiques qui seront éliminés par les cellules phagocytaires. L'autophagie, quant à elle, peut aussi être retenue comme hypothèse, car elle est observable lorsque les PS se localisent dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique (KESSEL et al., 2006 ; BUYTAERT et al., 2006). Par contre, il a été démontré qu'à haute dose de lumière (135 mJ/cm^2), il y avait peu d'autophagie détectée *in vitro* dans un modèle de leucémie murine, car la protéine Bcl-2 qui initie normalement l'autophagie, aurait été endommagée par la TPD. De plus, il a été suggéré que l'autophagie jouerait plutôt un rôle protecteur à la TPD lors de l'utilisation de doses de lumières sous-optimales (KESSEL et REINERS, 2007). La nécrose demeure aussi une avenue possible expliquant l'augmentation marquée d'utilisation de FDG suite à l'induction d'un phénomène inflammatoire principalement dû aux photo-dommages induits causant la perte d'intégrité membranaire. L'augmentation de la dose de TPD (dose de lumière ou concentration de PS) favorise la voie nécrotique plutôt qu'apoptotique. En effet, une forte dose de TPD produit une quantité massive d'oxygène réactif provoquant la chute drastique des niveaux d'ATP et une inhibition du métabolisme cellulaire général (BUYTAERT et al., 2007). Cet effet peut donc être associé avec ce qui a été observé immédiatement après le début de la TPD lors de l'application des taux de fluence de 100 à 200 mW/cm^2 . Le relâchement de cytokines et d'agents chimiotactiques en réponse à la lyse cellulaire favorise l'invasion du tissu traité,

par les neutrophiles principalement (GALLIN, 1989). Ces cellules sécrètent à leur tour des enzymes lysosomiales qui provoquent la destruction des cellules tumorales et endothéliales du tissu traité à la TPD. Cet effet massif sur le tissu amplifie la réponse inflammatoire et attire ensuite les mastocytes vers la zone d'inflammation et de déchets cellulaires (HENDERSON et al., 2004 ; CECIC et al., 2001 ; CECIC et al., 2006). Vient ensuite la libération de granules des mastocytes, contenant entre autres de l'histamine et d'autres agents vasoactifs. Finalement, la réponse immunitaire se termine par l'invasion du tissu par les macrophages et les monocytes, qui prolifèrent graduellement dans l'environnement afin de détruire les débris cellulaires causés par le traitement et les neutrophiles, de même que la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs qui diminuent par la suite la réaction immunitaire et inflammatoire (JOLLES CJ et al., 1988). Vu la multitude de cellules immunitaires et cytokines impliquées, il est évident que la nécrose provoquée par la TPD induit aussi une importante réaction d'inflammation dans le tissu. En effet, les macrophages présents dans la zone traitée induisent la production de prostaglandines et de leucotriènes qui sont principalement responsables de la douleur, de l'œdème, de la régulation des fonctions leucocytaires et de l'initiation et de l'amplification de l'inflammation (GALLIN, 1989). Suite à l'implication de toutes ces cellules immunitaires et de la vasodilatation induite au site de traitement, la demande énergétique et l'apport en FDG ne peuvent qu'être augmentés dans la région traitée à haut taux de fluence, ce qui peut d'ailleurs être une excellente hypothèse expliquant la réaugmentation massive de FDG suite au 30 minutes de TPD pour les groupes de 100 à 200 mW/cm².

Enfin, il demeure un point qui jusqu'à maintenant n'avait pas été pris en considération dans la réponse métabolique tumorale suivant la TPD avec le Photofrin[®] : l'atteinte de la vascularisation tumorale. En effet, cette réaction est considérée comme étant un acteur indirect dans la mort cellulaire, dû principalement à l'arrêt de l'apport en oxygène et en nutriment causé par un phénomène de stase vasculaire (FINGAR et al., 1992 ; BUSCH, 2006 ; HENDERSON et al., 1987). Une fois de plus, la destruction vasculaire induit une réaction immunitaire et inflammatoire similaire aux effets observés dans la nécrose avec un relâchement en grande quantité de thromboxanes et de leukotriènes vasoactives (MCMAHON et al., 1994). Il a été démontré que le Photofrin[®] crée une rapide déplétion en apport d'oxygène lors d'application d'un haut taux de fluence (150 mW/cm²), tandis que les niveaux d'oxygène demeurent au niveau basal pour un bas taux de fluence (30 mW/cm²). La création d'un milieu hypoxique est de plus associé à un plus faible taux de destruction des tumeurs ainsi qu'à un délai plus court de récupération suite aux dommages induits favorisant ensuite une croissance tumorale accrue par la suite (BUSCH, 2006). L'augmentation de l'expression du facteur de transcription HIF-1a induit par l'hypoxie joue d'ailleurs un rôle primordial dans la résistance des cellules. En effet, HIF-1a favorise l'activation de la glycolyse, de la synthèse d'ATP et de l'angiogénèse (VAN UDEN et al., 2008 ; LEE et al., 2004). Considérant l'élaboration de ces types de réponses cellulaires et vasculaires possibles pour la TPD impliquant la variation du taux de fluence, on peut vraisemblablement suggérer une classification des effets observés dépendamment des taux de fluence utilisés.

2.1-Bas taux de fluence (25 et 50 mW / cm²)

La faible baisse de métabolisme observée à 25 mW/cm² est compatible avec la diminution de production d'ATP et cette hypothèse peut aussi être applicable à 50 mW/cm² puisqu'il s'agit d'un phénomène observable rapidement, précurseur de l'apoptose engendrant une diminution du métabolisme. L'atteinte vasculaire peut être écartée des hypothèses en ce qui concerne l'utilisation des bas taux de fluence, puisqu'il y aurait eu une diminution de métabolisme beaucoup plus marquée due à un arrêt ou une diminution de l'apport en FDG. Finalement, la dose n'est pas assez importante pour favoriser la nécrose, ce qui est soutenu par un rehaussement de la captation en FDG résultant de la réaction inflammatoire observée à de hauts taux de fluence. L'hypothèse expliquant la diminution continue du métabolisme à 25 mW/cm², contrairement à tous les autres groupes, pourrait être tout simplement une meilleure efficacité du traitement. En effet, il a déjà été rapporté que l'utilisation d'un bas taux de fluence diminue les effets secondaires, maintient l'oxygénation du tissu nécessaire à la production d'oxygène singulet et favorise l'apoptose (HENDERSON BW et al., 2006). Donc, selon les résultats obtenus, il serait possible d'observer grâce à l'imagerie TEP en temps réel une réponse favorable 2 heures suivant la TPD à 25 mW/cm² menant à l'éradication de la tumeur. Le groupe ayant subi la TPD à 50 mW/cm² quant à lui, suggère lui aussi un maintien de la perfusion et peu d'effets secondaires, mais le succès du traitement ne peut être confirmé à l'aide de ce protocole d'imagerie utilisé. L'augmentation marquée de 47% du taux de captation tumorale suivant la fin de l'illumination peut toutefois suggérer que les mécanismes énergétiques nécessaires à l'apoptose sont présents. Il serait par conséquent très intéressant de vérifier la réponse métabolique au-delà de 2 h post-TPD. Ainsi, si la

captation tumorale du FDG s'avérait diminuée, l'hypothèse de l'apoptose observable seulement plus tardivement post-PDT à 50 mW/cm² pourrait s'avérer appropriée. Par contre, suite à une expérience préliminaire utilisant la résonance magnétique rehaussée avec un agent de contraste visant à visualiser la vascularisation (Gd-DTPA) suivant la TPD, il n'est toutefois pas impossible d'écarter la nécrose pour ce groupe (Fig. 13 et 14). En effet, une zone autour de la tumeur correspondait à de l'œdème et de l'inflammation, caractéristiques principales de la nécrose et d'une plus grande demande en énergie. Les expérimentations et les analyses concernant ce projet sont toujours en cours et ne permettent pas d'apporter d'autres informations plus précises pour l'instant.

2.2-Hauts taux de fluence (100 à 200 mW / cm²)

Pour tous les taux de fluence de ce groupe, il est possible d'observer une baisse marquée du métabolisme suivant le début de l'illumination. Cette baisse pourrait être associée à l'effet précurseur de la diminution de la production d'ATP et à l'activation des caspases impliquées dans l'apoptose, mais aussi à une diminution de la perfusion. En effet, comparativement au groupe des bas taux de fluence, la baisse est beaucoup plus marquée, nécessitant une addition d'effets sur les cellules tumorales. En plus de provoquer une diminution directement sur les cellules tumorales, la perfusion crée un milieu hypoxique et une diminution ou un arrêt de l'apport en FDG. Ces effets semblent plus marqués à 100 et 200 mW/cm². Tout comme pour le groupe de 50 mW/cm², il est possible que l'on observe seulement la demande en énergie nécessaire au processus de l'apoptose et que la seule différence concerne l'atteinte vasculaire, créant une diminution de perfusion qui n'est pas observée à 50 mW/cm². Ceci pourrait expliquer la faible augmentation du taux

de captation de FDG de 9% (comparativement à la valeur de départ) pour le groupe de 100 mW/cm². Finalement, les groupes de 150 et 200 mW/cm² démontrent vraisemblablement les phénomènes d'activation des caspases et de la diminution d'ATP immédiatement après le début de l'illumination combinées à une diminution, voire même un arrêt de la perfusion dans le cas de 200 mW/cm². Leur retour à un métabolisme très élevé (augmentation de 48 et 64 % respectivement par rapport au taux de captation du FDG basal) suivant la fin du traitement peut donc être expliquée par l'énergie nécessaire à l'apoptose, mais aussi à une très grande inflammation créée par de la nécrose induite durant la TPD. Cette hypothèse est soutenue par les expérimentations faites en IRM utilisant un agent de contraste permettant de visualiser la vascularisation à 1h post-TPD. En effet, l'IRM démontre une région grandement rehaussée correspondant à de l'œdème et de l'inflammation. Une analyse sommaire des images obtenues en IRM permet d'ailleurs de suggérer que l'étendue de l'œdème et de l'inflammation est beaucoup plus importante à 200 mW/cm² qu'à 50 mW/cm² (Fig. 13 et 14). Les analyses concernant la quantification de l'œdème et de l'inflammation sont toujours en cours et devront être poursuivies pour confirmer ces observations. Une fois de plus, il serait intéressant de pouvoir connaître le métabolisme en temps réel des tumeurs au-delà de 2 h post-TPD afin de savoir quel est le meilleur choix de taux fluence visant à atteindre une efficacité thérapeutique optimale.

3-Délais de réponse ($\Delta 1$) et délais de restauration de la captation tumorale de FDG ($\Delta 2$)

Les résultats concernant le temps nécessaire afin de percevoir un changement de métabolisme ($\Delta 1$ et $\Delta 2$) n'étant pas significatifs, il est impossible de déduire si la

variation du taux de fluence peut influencer la rapidité d'action ou l'efficacité de la TPD. Par contre, un fait demeure intéressant concernant la durée de la diminution du métabolisme : la variation du taux de fluence combinée à une variation de la dose totale de lumière ne semble pas jouer un rôle important sur la durée de l'effet observé immédiatement après le début de l'illumination. Selon ces résultats, la durée d'illumination serait ainsi responsable de la réponse immédiate à la TPD et ce, indépendamment de la variation du taux de fluence et de la dose totale. Par contre, même si les résultats ne sont pas significatifs, les délais obtenus pour observer les variations de taux de captation de FDG, et donc les variations de métabolisme, sont consistants avec les effets observables précurseurs de l'activation de l'apoptose et d'une diminution de la perfusion.

CONCLUSION

En conclusion, l'imagerie TEP en temps réel avec l'utilisation du FDG comme radiotraceur permet d'identifier différents profils de réponse métabolique d'une tumeur traitée à la TPD selon des taux de fluence variables. À partir des résultats obtenus, nous postulons que l'utilisation d'un bas taux de fluence, tel que 25 mW/cm^2 , pourrait favoriser une mort par mécanisme d'apoptose et minimiser les effets secondaires inflammatoires et immunitaires. L'augmentation du taux de fluence aurait un effet sur la perfusion tumorale et l'apparition de nécrose induisant de l'inflammation suivant la TPD. La diminution de la perfusion tumorale a pu être observée par une chute drastique de la captation tumorale de FDG suite au traitement, de manière plus marquée avec les plus hauts taux de fluence (100 à 200 mW/cm^2). L'inflammation quant à elle, combinée à l'apoptose, augmente la demande énergétique de la région traitée dû à la forte concentration de cellules immunitaires. De plus, des études préliminaires en IRM à différents temps post-TPD proposent une étendue plus élevée de l'inflammation et de l'œdème suite à la TPD à 200 mW/cm^2 comparativement à 50 mW/cm^2 . Toutefois, le protocole d'imagerie TEP en temps réel utilisé dans le cadre de ce travail ne reflète que les 2 h suivant la TPD. L'analyse des résultats a clairement fait ressortir qu'il serait très intéressant d'allonger la période d'imagerie de plusieurs heures afin de répondre aux

questions soulevées par l'interprétation des mécanismes d'action de la TPD et l'évaluation de l'efficacité métabolique du traitement. En effet, puisqu'aucune régression n'est observée dans la captation tumorale de FDG, il est possible que les tumeurs n'aient pas été traitées de façon optimale pour éradiquer complètement les cellules tumorales. Par conséquent, toutes les hypothèses suggérées dans le présent document pourraient s'avérer non-fondées. Aussi, il serait primordial de vérifier la présence de l'apoptose et de la nécrose à différents temps dans tous les groupes afin de mieux soutenir les travaux déjà réalisés. À cet égard, les travaux de Cauchon et al., 2007 suggèrent une façon non-invasive de détecter l'apoptose chez la souris via l'imagerie TEP combinée à la streptavidine marquée au Cu⁶⁴. Des tumeurs pourraient aussi être prélevées dans chaque groupe de taux de fluence afin d'identifier l'activation des caspases ou le relâchement du cytochrome c. Krysko et al., 2008 décrit d'ailleurs une méthode d'immunobuvardage de type Western appropriée pour cette approche. Finalement, l'imagerie TEP combinée à la TPD chez un modèle animal permet de mieux comprendre l'implication de la lumière dans les premiers instants suivant la TPD et elle donne un moyen rapide et efficace de mieux comprendre et d'optimiser les protocoles d'illumination dans la TPD du cancer. Ce projet a aussi permis de suggérer d'autres protocoles de recherche visant à mieux comprendre et améliorer divers traitements de cancer *in vivo*.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, Dr Roger Lecomte et Dr Johan E. van Lier, de m'avoir accueillie dans leur laboratoire et d'avoir été présents lors de mes questionnements et incompréhensions multiples dans les domaines de l'imagerie moléculaire et de la thérapie photodynamique. Je voudrais d'ailleurs les remercier de m'avoir soutenue et fait confiance tout au long de mon projet de maîtrise et de m'avoir permis de participer à plusieurs congrès internationaux et à des projets de collaboration avec d'autres équipes de recherche. Leur support m'a permis de rencontrer plusieurs personnes de divers champs d'intérêts et d'avoir confiance en mes aptitudes d'étudiante chercheuse. Je voudrais, de plus, remercier les Drs Martin Lepage et Luc Tremblay pour leur précieuse aide apportée en résonance magnétique. Aussi, mes remerciements vont aux Dre Caroline Saucier et Dr Benoît Paquette qui ont généreusement accepté de corriger ce travail, m'apportant ainsi des commentaires et des correctifs de différents points de vue biologiques.

Je me dois également de mentionner certains de mes collègues qui m'ont été d'une grande aide tout au long de mes années passées au laboratoire. Donc je désire remercier tout spécialement Nicole Cauchon pour son aide en TPD, Jules Cadorette et Jean-François Beaudoin qui ont été des acteurs clés à l'élaboration de mon protocole d'imagerie,

Christian Thibaudeau qui m'a permis d'exploiter l'analyse selon 5 paramètres et Mélanie Bergeron qui m'a permis de démystifier les principes et les subtilités de l'imagerie TEP.

Finalement, je ne peux oublier tous les membres du centre de recherche clinique ainsi que ceux du 6^e étage qui ont grandement favorisé une ambiance de travail des plus agréables et divertissantes. Sans vous, jamais le travail n'aurait été aussi amusant !

Merci à vous tous

Kim

BIBLIOGRAPHIE

AGOSTINIS P, BUYTAERT E, BREYSSSENS H, HENDRICKX N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 3, 721-729.

ALLISON BA, PRITCHARD PH, LEVY JG. Evidence for low density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Br J Cancer.* 1994, 69, 329-334.

ALLISON RR, DOWNIE GH, CUENCA R, HU XH, CHILDS CJH, SIBATA CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2004, 1, 27-42.

ALMEIDA RD, MANADAS BJ, CARVALHO AP, DUARTE CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1704, 59-86.

AUTHIER S, TREMBLAY S, DUMULON V, DUBUC C, OUELLET R, LECOMTE R, CUNNANE SC, BENARD F. [11C] acetoacetate utilization by breast and prostate tumors: a PET and biodistribution study in mice. *Mol Imaging Biol.* 2008, 10, 217-223.

AXCAN PHARMA INC. Photofrin®. Disponible à l'URL: <http://www.axcan.com/pdf/photofrin-FR.pdf>. Consulté le 2 février 2009.

BELL G, KAYANO T, BUSE J, Burant C, TAKEDA J, LIN D, FUKUMOTO H, SEINO S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care.* 1990, 13, 198-208.

BELLSNIER DA, LIN CW. Photosensitization and split-dose recovery in cultured human urinary bladder carcinoma cells containing nonexchangeable hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.* 1985, 45, 2507-2511.

BÉRARD V, ROUSSEAU JA, CADORETTE J, HUBERT L, BENTOURKIA M, VAN LIER JE, LECOMTE R. Dynamic imaging of transient metabolic processes by small-animal PET for the evaluation of photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. *J Nucl Med.* 2006, 47, 1119-1126.

BOLIN FP, PREUSS LE, CAIN BW. A comparison of spectral transmittance for several mammalian tissues : effects at PRT frequencies. In: Doiron DR, Gomer CJ, Alan R editor. *Porphyrin Localization and Treatment Tumors.* New York : Liss, 1984, 211-225.

BROWN SB, BROWN EA, WALKER I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004, 5, 497-508.

BUSCH TM. Local physiological changes during photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2006, 38, 494-499.

BUYTAERT E, CALLEWAERT G, HENDRICKX N, SCORRANO L, HARTMANN D, MISSIAEN L, VANDENHEEDE JR, HEIRMAN I, GROOTEN J, AGOSTINIS P. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J.* 2006, 20, 756-758.

BUYTAERT E, DEWAELE M, AGOSTINIS P. Molecular effector of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007, 1776, 86-107.

BYRNE AT, O'CONNOR AE, HALL M, MURTAGH J, O'NEILL K, CURRAN KM, MONGRAIN K, ROUSSEAU JA, LECOMTE R, MCGEE S, CALLANAN JJ, O'SHEA DF, GALLAGHER WM. Vascular-targeted photodynamic therapy with BF-2 chelated Tetraaryl-Azadipyromethene agents: a multi-modality molecular imaging approach to therapeutic assessment. *Br J Cancer.* 2009. [publication en cours]

CECIC I, STOTT B, KORBELIK M. Acute phase response-associated systemic neutrophil mobilization in mice bearing tumors treated by photodynamic therapy. *Int Immunopharmacol.* 2006, 6, 1259-1266.

CECIC I, PARKINS CS, KORBELIK M. Induction of systemic neutrophil response in mice by photodynamic therapy of solid tumor. *Photochem Photobiol.* 2001, 74, 712-720.

CHEN B, POGUE BW, GOODWIN IA, O'HARA JA, WILMOT CJ, HUTCHINS JE, HOOPEES PJ, HASAN T. Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor. *Radiat Res.* 2003, 160, 452-459.

CAUCHON N, LANGLOIS R, ROUSSEAU JA, TESSIER G, CADORETTE J, LECOMTE R, HUNTING DJ, PAVAN RA, ZEISLER KS, VAN LIER JE. PET imaging of apoptosis with (64)Cu-labeled streptavidin following pretargeting of phosphatidylserine with biotinylated annexin-V. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007, 34, 247-258.

CHERRY SR, GAMBHIR SS. Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR J.* 2001, 42, 219-232.

DELLINGER M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol.* 1996, 64, 182-187.

DOUGHERTY TJ. Activated dyes as antitumor agents. *J Natl Cancer Inst.* 1974, 52, 1333-1336.

DOUGHERTY TJ, GOMER CJ, HENDERSON BW, JORI G, KESSEL D, KORBELIK M, MOAN J, PENG Q. Photodynamic therapy. *J. Natl Cancer Inst.* 1998, 90, 889-905.

DOUGHERTY TJ, KAUFMAN JE, GOLDFARB A, WEISHAUP T KR, BOYLE D, MITTLEMAN A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 1978, 38, 2628-2635.

DOUGHERTY TJ, POTTER WR. Of what value is a highly absorbing photosensitizer?. *J Photochem Photobiol B.* 1991, 8, 233-234.

DRABKIN DL. Selected landmarks in the history of porphyrins and their biologically functional derivatives. In: Dolphin D, editor. *The porphyrins.* Academic Press. 1978, 31-84.

FIGGE FHJ. The relationship of pyrrol compounds to carcinogenesis. In: Moulton FR, editor. *AAAS Research conf. On cancer.* 1945, 117-128.

FIGGE FHJ, WEILAND GS, MANGANIELLO LOJ. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic embryonic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1948, 68, 143-146.

FINGAR VH, HENDERSON BW. Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: a study of tumor and normal tissue response. *Photochem Photobiol.* 1987, 46, 837-841.

FINGAR VH, WIEMAN TJ, WIEHLE SA, CERRITO PB. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: The effect of treatment on vessel constriction, permeability and leukocyte adhesion. *Cancer Res.* 1992, 52, 4914-4921.

FOOTE CS. Mechanisms of photo-oxygenation. In: Doiron DR, Gomer CJ, Alan R editor. *Porphyrin Localization and Treatment Tumors.* New York: Liss, 1984, 3-18.

FOOTE CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991, 54, 659.

FOSTER TH, MURANT RS, BRYANT RG, KNOX RS, GIBSON SL, HILF R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res.* 1991, 126, 296-303.

FRIEDBERG JS, MICK R, STEVENSON J, METZ J, ZHU T, BUYSKE J, STERMAN DH, PASS HI, GLATSTEIN E, HAHN SM. A phase I study of Foscan-mediated photodynamic therapy and surgery in patients with mesothelioma. *Ann Thorac Surg.* 2003, 75, 952-959.

GALLIN JI. Inflammation. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. New York: Raven Press, 1989, 721-733.

GIBSON SL, VANDERMEID KR, MURANT RS, RAUBERTAS RF, HILF R. Effects of various photoradiation regimens on the antitumor efficacy of photodynamic therapy for R3230AC mammary carcinomas. *Cancer Res.* 1990, 50, 7236-7241.

GOLLNICK SO, LIU X, OWCZARCAK B, MUSSER DA, HENDERSON BW. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy *in vivo*. *Cancer Res.* 1997 57, 3904-3909.

GRANVILLE DJ, CARTHY CM, JIANG H, SHORE GC, MCMANUS BM, HUNT DW. Rapid cytochrome c release, activation caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. *FEBS Lett.* 1998, 437, 5-10.

HENDERSON BW, BUSCH TM, SNYDER JW. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers Surg med.* 2006, 38, 489-493.

HENDERSON BW, DOUGHERTY TJ. How does photodynamic therapy work ?. *Photochem Photobiol.* 1992, 55, 145-157.

HENDERSON BW, FINGAR VH. Relationship between tumor hypoxia and response to photodynamic therapy treatment in an experimental mouse model. *Cancer Res.* 1987, 47, 3110-3114.

HENDERSON BW, GOLLNICK SO, SNYDER JW, BUSCH TM, KOUSIS PC, CHENEY RT, MORGAN J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res.* 2004, 64, 2120-2126.

HILF R, WARNE NW, SMAIL DB, GIBSON SL. Photodynamic inactivation of selected intracellular enzymes by hematoporphyrin derivative and their relationship to tumor cell viability *in vitro*. *Cancer Lett.* 1984, 24, 165-172.

HSI RA, ROSENTHAL DI, GLATSTEIN E. Photodynamic therapy in the treatment of cancer. *Drugs.* 1999, 57, 725-734.

HSIEH YJ, WU CC, CHANG CJ, YU JS. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol.* 2003, 194, 363-375.

KESSEL D. Chemical and biochemical determinants of porphyrin localization. In: Doiron DR, Gomer CJ, Alan R editor. *Porphyrin Localization and Treatment Tumors*. New York: Liss, 1984, 405-418.

- JOLLES CJ, OTT MJ, STRAIGHT RC. Systemic immunosuppression induced by peritoneal photodynamic therapy. *Am J Obstet Gynecol*. 1988, 158, 1446-1453.
- KESSEL D, LUO Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B*. 1998, 42, 89-95.
- KESSEL D, LUO Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999, 6, 28-35.
- KESSEL D, LUO Y, DENG Y, CHANG CK. The role of sub-cellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1997, 65, 422-426.
- KESSEL D, REINERS Jr JJ. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol*. 2007, 83, 1024-1028.
- KESSEL D, VICENTE MG, REINERS Jr JJ. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*. 2006, 38, 482-488.
- KIM SA, KIM YC, KIM SW, LEE SH, MIN JJ, AHN SG, YOON JH. Antitumor activity of novel indirubin derivatives in rat tumor model. *Clin Cancer Res*. 2007, 13, 253-259.
- KORBELIK M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg*. 1996, 14, 329-334.
- KORBELIK M, KROSL G. Enhanced macrophage cytotoxicity against tumor cells treated with photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1994, 60, 497-502.
- KROEMER G, ZAMZAMI N, SUSIN AA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*. 1997, 18, 44-51.
- KROSL G, KORBELIK M, DOUGHERTY GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 1995, 71, 549-555.
- KRYSKO DV, VANDEN BERGHE T, VANDENABEELE P. Apoptosis and necrosis detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 2008, 44, 205-221.
- LECOMTE R, BENTOURKIA M, BÉNARD F. Tomographie d'émission par positrons en oncologie. *La physique au Canada*. 2002, 58, 109-117.
- LEE JW, BAE SH, JEONG JW, KIM SH, KIM KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004, 36, 1-12.
- LIPSON RL, BALDES EJ, OLSEN AM. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst*. 1961, 26, 1-11.

- LIU K, TANG Q, FU C, PENG J, YANG H, LI Y, HONG H. Influence of glucose starvation on the pathway of death in insect cell line SI : apoptosis follows autophagy. *Cytotechnology*. 2007, 54, 97-105.
- LIU X, KIM CN, YANG J, JEMMERSON R, WANG X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996, 86, 147-157.
- MACDONALD IJ, DOUGHERTY TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines*. 2001, 5, 105-129.
- MATROULE JY, CARTHY CM, GRANVILLE DJ, JOLOIS O, HUNT DW, PIETTE J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-A methylester photosensitization. *Oncogene*. 2001, 20, 4070-4084.
- MAZIERE JC, MORLIERE P, SANTUS R. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumors. *J Photochem Photobiol B*. 1991, 8, 351-360.
- MCCMAHON KS, WIEMAN TJ, MOORE PH, FINGAR VH. Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorine e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response. *Cancer Res*. 1994, 54, 5374-5379.
- MENON C, KUTNEY SN, LEHR SC, HENDREN SK, BUSCH TM, HAHN SM, FRAKER DL. Vascularity and uptake of photosensitizer in small human nodules: Implication for intraperitoneal photodynamic therapy. *Clin Cancer Res*. 2001, 7, 3904-3911.
- MOOR ACE. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2000, 57, 1-13.
- MULLER PJ, WILSON BC. Photodynamic therapy for malignant newly diagnosed supratentorial gliomas. *J Clin Laser Med Surg*. 1996, 14, 263-270.
- NICHOLS MG, FOSTER TH. Oxygen diffusion and reaction kinetics in the photodynamic therapy of multicell tumour spheroids. *Phys Med Biol*. 1994, 39, 2161-2181.
- OLEINICK NL, EVANS HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res*. 1998, 150, S146-S156.
- OLEINICK NL, MORRIS RL, BELICHENKO I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy : what, where, why and how. *Photochem Photobiol Sci*. 2002, 1, 1-21.
- PANDEY RK, MAJCHRZYCKI JF, SMITH KM, DOUGHERTY TJ. Chemistry of Photofrin II and some new photosensitizers. *Proc SPIE*. 1989, 1065, 164-174.

PANDEY RK, MARSHALL SM, TSAO M, MCREYNOLDS JH, DOUGHERTY TJ. Fast atom bombardment mass spectral analysis of Photofrin II and its synthetic components. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1990, 19, 404-415.

PASS HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanism and clinical use. *J Natl Cancer Inst.* 1993, 85, 443-456.

PENG Q, MOAN J, NESLAND JM. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol.* 1996, 20, 109-129.

PENG Q, MOAN J, NESLAND JM, RIMINGTON C. Aluminium phthalocyanines with asymmetrical lower sulfonation and with symmetrical higher sulfonation: A comparison of localizing and photosensitizing mechanism in human tumor LOX xenografts. *Int J Cancer.* 1990, 46, 719-726.

PETIT J, MINELLO A, DUVILLARD L, JOOSTE V, MONIER S, TEXIER V, BOUR J, POUSSIER A, GAMBERT P, VERGES B, HILLON P. Cell surface expression of LDL receptor in chronic hepatitis C : correlation with viral load. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007, 293, E416-E420.

PHELPS ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97, 9226-9233.

POPOVIC EA, KAYE AH, HILL JS. Photodynamic therapy of brain tumors. *J Clin Laser Med Surg.* 1996, 14, 251-261.

POTTIER R, KENNEDY JC. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J Photochem Photobiol B.* 1990, 8, 1-16.

QUIN B, SELMAN SH, PAYNE KM, KECK RW, METZGER DW. Enhanced skin allograft survival after photodynamic therapy. Association with lymphocyte inactivation and macrophage stimulation. *Transplantation.* 1993, 56, 1481-1486.

RAAB O. Ueber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Z Biol.* 1900, 39, 524-546.

RASMUSSEN-TAXDAL DS, WARD DE, FIGGE FHJ. Fluorescence of human lymphatic and cancer tissue following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Cancer.* 1955, 8, 78-81.

RIGO P, PAULUS P, KASCHTEN BJ, HUSTINX R, BURY T, JERUSALEM G, BENOIT T, FOIDART-WILLEMS J. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med.* 1996, 23, 1641-1674.

SCHIEPERS C, HOH CK. Positron emission tomography as a diagnostic tool in oncology. *Eur. Radiol.* 1998, 8, 1481-1494.

SHARMAN WM, ALLEN CM, VAN LIER JE. Photodynamic therapeutics : basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today.* 1999, 4, 507-517.

SHARMAN WM, ALLEN CM, VAN LIER JE. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 2000, 319, 376-400.

SIEGEL MM, TABELI K , TSAO R, PASTEL MJ, PANDEY RK, BERKENKAMP S, HILLENKAMP F, DE VRIES MS. Comparative mass spectrometric analyses of Photofrin oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry, UV and IR matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, electrospray ionization mass spectrometry and laser desorption/jet-cooling photoionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 1999, 34, 661-669.

SOLBAN N, RIZVI I, HASAN T. Targeted photodynamic therapy, *Lasers Surg. Med.* 2006, 38, 522-531.

SONCIN M, POLO L, REDDI E, JORI G, KENNEY ME, CHENG G, RODGERS MA. Effect of axial ligation and delivery system on the tumor-localising-and-photosensitizing properties of Ge (IV)-octabutoxy-phthalocyanines. *Br J Cancer.* 1995, 71, 727-732.

STAR WM, MARIJNISSEN HP, VAN DEN BERG-BLOK AE, VERSTEEG JA, FRANKEN KA, REINHOLDS HS. Destruction of fat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.* 1986, 46, 2532-2540.

SUNDARESAN G, YAZAKI PJ, SHIVELY JE, FINN RD, LARSON SM, RAUBISTCHEK AA, WILLIAMS LE, CHATZIOANNOU AF, GAMBHIR SS, WU AM. 124I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med.* 2003, 44, 1962-1969.

SVAASAND LO. Optical dosimetry for direct and interstitial photoirradiation therapy of malignant tumors. In: Doiron DR, Gomer CJ , Alan R editor. *Porphyrin Localization and Treatment Tumors.* New York : Liss, 1984, 91-114.

SVAASAND LO, POTTER WR. The implication of photobleaching for photodynamic therapy. In: Henderson BW, Dougherty TJ, Dekker M editor, New York, 1992, 369-385.

TROMBERG BJ, ORENSTEIN A, KIMEL S, BARKER SJ, HYATT J, NELSON JS, BERNS MW. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1990, 52, 375-385.

VAN UDEN P, KENNETH NS, ROCHA S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J.* 2008, 412, 477-484.

VARNES ME, CHIU SM, XUE LY, OLEINICK NL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999, 255, 673-679.

WEISHAUPT KR, GOMER CJ, DOUGHERTY TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res*. 1976, 36, 2326-2329.

WILKISCH PA, JACKA F. Studies of light propagation through tissue. In: Doiron DR, Gomer CJ, Alan R editor. *Porphyrin Localization and Treatment Tumors*. New York : Liss, 1984, 149-161.

WILSON BC, JEEVES WP, LOWE DM, ADAM G. Light propagation in animal tissues in the wavelength range 375-825 nanometers. In: Doiron DR, Gomer CJ, Alan R editor. *Porphyrin Localization and Treatment Tumors*. New York : Liss, 1984, 115-132.

WILSON BC, PATTERSON MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*. 2008, 53, R61-109.

WOHRLE D, HIRTH A, BOGDAHN-RAI T, SCHNURPFEIL G, SHOPOVA M. Photodynamic therapy of cancer: Second and third generations of photosensitizers. *Russ Chem Bull*. 1998, 47, 807-816.

WU JC, INUBUSHI M, SUNDARESAN G, SCHELBERT HR, GAMBHIR SS. Positron emission tomography imaging of cardiac reporter gene expression in living rats. *Circulation*. 2002, 106, 180-183.

YAMAMOTO N, HOOBER JK, YAMAMOTO N, YAMAMOTO S. Tumoricidal capacities of macrophages photodynamically activated with hematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol*. 1992, 56, 245-250.

ANNEXE 1

Exemple de calcul pour obtenir la dose totale de lumière (J / cm²)

$$1 \text{ J} = 1 \text{ W} \times \text{s}$$

Si application d'un taux de fluence de 200 mW/cm²

Taux de fluence (mW) x temps (s) = Dose totale en J

$$200 \times 10^{-3} \text{ W} \times 2000 \text{ s} = 400 \text{ J}$$